

Dissertation

**Magnetische Thermoablation zur
minimal invasiven Beseitigung von
Brusttumoren:
In-vitro-Untersuchungen an einer
humanen Adenokarzinomzelllinie**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
von Sylvia Frühauf, geboren am 10. Juli 1975 in Bernburg

Gutachter

- 1. Prof. Dr. med. Dipl. chem. Werner A. Kaiser**
- 2. Prof. Dr. rer. Nat. Wilfried Andrä**
- 3. Prof. Dr. med. Achim Schneider**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 7. Oktober 2003

„Der Arzt ist, anders als der Naturwissenschaftler... mit einem einzelnen Organismus, dem menschlichen Subjekt, befasst, das danach strebt, seine Identität unter widrigen Umständen zu bewahren.“

(Ivy McKenzie)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1. Einleitung.....	7
2. Arbeitsutensilien.....	16
2.1 Lösungen und Chemikalien	16
2.2 Materialien	17
2.3 Geräte	18
3. Methoden	19
3.1 Sterilisierung von Ferrofluiden	19
3.1.1 CHARAKTERISIERUNG DER FERROFLUIDE	19
3.1.2 STERILISATION DER FERROFLUIDE	20
3.2. Wechselwirkungen zwischen Zellmembran und Magnetitpartikeln	21
3.2.1 ARBEITEN MIT ZELLEN	21
3.2.1.1 Auftauen und Einfrieren der Zellen	22
3.2.1.2 Standardkulturbedingungen	22
3.2.1.3 Ernten und Passagieren der Zellen	22
3.2.1.4 Test auf Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen	23
3.2.2 WECHSELWIRKUNGEN VON MAGNETITPARTIKELN MIT DER ZELLMEMBRAN	24
3.3 Evaluierung der minimalen kritischen Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen durch Erwärmung im Wasserbad	25
3.3.1 VORBEREITUNGEN UND VORVERSUCHE	25
3.3.1.1 Bau einer Vorrichtung zur Temperaturmessung einer Zellsuspension unter sterilen Bedingungen	25
3.3.1.2 Bau eines Thermoelementes	25
3.3.1.3 Kalibrierung eines Thermoelementes	26
3.3.1.4 Experimente zur Bestimmung der Parameter zur Erwärmung von Zellkulturmedium auf definierte Temperaturen	27
3.3.2 EVALUIERUNG DER MINIMALEN KRITISCHEN TEMPERATUR ZUR IRREVERSIBLEN SCHÄDIGUNG VON ZELLEN DURCH ERWÄRMUNG IM WASSERBAD	29
3.3.2.1 Erwärmung von Zellen im Wasserbad	29
3.3.2.2 Vitalitätstest	29
3.3.3 ZYTOSKELETTDARSTELLUNG VON WÄRMEEXPONierten IM VERGLEICH ZU NICHT WÄRMEEXPONierten ZELLEN.....	30
3.4 Wärmebehandlung von Zellen durch magnetische Thermoablation	32
3.4.1 VORBEREITENDE VERSUCHE	32
3.4.1.1 Überprüfung der Zytotoxizität verschiedener Ferrofluidproben	32
3.4.1.2 Bestimmung der spezifischen Absorptionsrate (SAR) einer ausgewählten Magnetitprobe	32
3.4.1.3 Bestimmung der Magnetitmenge zum Erreichen der kritischen Temperatur für die irreversible Schädigung von Zellen mittels magnetischer Thermoablation ...	35

3.4.2 WÄRMEBEHANDLUNG VON ZELLEN DURCH MAGNETISCHE THERMOABLATION MITTELS EINER AUSGEWÄHLTEN MAGNETITPROBE	37
3.4.3 BERECHNUNG DER APPLIZIERTEN HITZEDOSEN WÄHREND DER WÄRMEBEHANDLUNG VON ZELLEN IM WASSERBAD UND MITTELS MAGNETISCHER THERMOABLATION IM MAGNETWECHSELFELD	37
4. Ergebnisse	38
4.1 Sterilisation der Ferrofluide	38
4.2 Ergebnisse der Wechselwirkung von Magnetitpartikeln mit der Zellmembran humaner Adenokarzinomzellen	38
4.2.1 ERGEBNIS ZUR KONTROLLE DER ZELLKULTUREN AUF MYKOPLASMEN	38
4.2.2 MORPHOLOGISCHE BEOBACHTUNGEN DER WECHSELWIRKUNG VON MAGNETITPARTIKELN MIT DER ZELLMEMBRAN HUMANER ADENOKARZINOMZELLEN	40
4.3 Die kritische Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen durch Erwärmung im Wasserbad	44
4.3.1 PARAMETER ZUR ERWÄRMUNG VON ZELLKULTURMEDIUM AUF DEFINIERTE ZIELTEMPERATUREN.....	44
4.3.2 DIE KRITISCHE TEMPERATUR ZUR IRREVERSIBLEN SCHÄDIGUNG VON ZELLEN DURCH ERWÄRMUNG IM WASSERBAD	44
4.3.3 ERGEBNISSE DER ZYTOSKELETTDARSTELLUNG VON WÄRMEEXPONierten ZELLEN IM VERGLEICH ZU NICHT WÄRMEEXPONierten ZELLEN	46
4.4 Ergebnisse der Wärmebehandlung von Zellen durch magnetische Thermoablation	48
4.4.1 ERGEBNISSE DER VORBEREITENDEN VERSUCHE	48
4.4.1.1 Ergebnisse der Zytotoxizitätsprüfung von Ferrofluiden	48
4.4.1.2 Die SAR eines ausgewählten Ferrofluids	48
4.4.1.3 Das Ferrofluidvolumen zum Erreichen der kritischen Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen durch magnetische Thermoablation	50
4.4.2 ERGEBNISSE DER WÄRMEBEHANDLUNG VON ZELLEN DURCH MAGNETISCHE THERMOABLATION MITTELS EINER AUSGEWÄHLTEN MAGNETITPROBE	50
4.4.3 DIE APPLIZIERTEN HITZEDOSEN WÄHREND DER EXPOSITION VON ZELLEN IM WASSERBAD UND IM MAGNETWECHSELFELD	52
5. Diskussion	53
5.1 Sterilisierung von Ferrofluiden	53
5.2 Wechselwirkung von Magnetitpartikeln mit der Zellmembran	54
5.3 Die kritische Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen durch Erwärmung im Wasserbad	56
5.4 Wärmebehandlung von Zellen durch magnetische Thermoablation	59
6 Zusammenfassung	65
7 Literaturverzeichnis	67
Danksagung	75
Lebenslauf	76
Ehrenwörtliche Erklärung	77

Abkürzungen

μl	Mikroliter
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d. h.	das heißt
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
\varnothing	Durchmesser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et aliae (und andere)
f	Frequenz
Fe_3O_4	Eisen(II, III)-oxid
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
Gd-DTPA	Gadolinium-DTPA
GDPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
H	magnetische Feldstärke
h	Stunde(n)
H_2O	Wasser
HIFF	High-Frequency-Thermoablation
IgG	Immunglobulin G
IPHT	Institut für physikalische Hochtechnologie
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
M	Molar
MEM	Minimum Essential Medium
m_{E}	Masse Eisenoxid
m_{FF}	Masse Ferrofluid

mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MR-Mammographie	Magnetresonanz-Mammographie
m_w	Masse Wasser
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
p_E	Dichte Eisenoxid
p_{FF}	Dichte Ferrofluid
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
p_w	Dichte Wasser
RITA	Radio-Frequency-Thermoablation
s	Sekunde(n)
SAR	spezifische Absorptionsrate
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
Tst	Sterilisationstemperatur
V_E	Volumen Eisenoxid
V_{FF}	Volumen Ferrofluid
V_w	Volumen Wasser
W	Watt
Zst	Sterilisationszeit

1. Einleitung

Die Diagnose und Behandlung von Tumoren der weiblichen Brust beschäftigt die Menschheit seit tausenden von Jahren. Bereits 3000 v. Chr. beschrieben Ägypter Brusttumoren von harter Konsistenz im Zusammenhang mit Flüssigkeitsabsonderungen, Entzündungen und Abszessen. Indische Schriften von 2000 v. Chr. erwähnen die operative Exstirpation, das Ausbrennen und die Gabe von arsenhaltigen Mixturen als Behandlungsmöglichkeiten für Brusttumoren [Donegan 1988].

In heutiger Zeit, an der Wende zum dritten Jahrtausend, sind die Behandlungsmöglichkeiten und Überlebenschancen bei Brustkrebs, verglichen zum Altertum, weitaus günstiger. Dennoch gibt es nach wie vor keine ideale Therapieform. Dies spiegelt sich in statistischen Daten wider, nach denen in Deutschland jährlich 43 000 Frauen an Brustkrebs erkranken. Es ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen im Alter zwischen 40 und 55 Jahren. Die Erkrankung ist für 25% aller Krebsneuerkrankungen und 18% aller Krebstodesfälle verantwortlich [Batzler et al. 1997]. Ursache ist die oft zu späte Diagnose der Brustkrebserkrankung. Wie andere Tumorerkrankungen auch macht sie sich erst durch Spätsymptome oder morphologische Veränderungen mit daraus folgenden funktionellen Veränderungen bemerkbar, da Tumoren in der Frühphase ihrer Entstehung meist keine Schmerzen verursachen.

Die Diagnostik von Brusttumoren wurde in den letzten Jahren durch die Möglichkeiten der Mammographie, der Ultraschalluntersuchung und insbesondere durch die dynamische Magnetresonanz-Mammographie (MR-Mammographie) verbessert [Kaiser & Zeitler 1989]. Vor allem die dynamische MR-Mammographie verfügt über eine hohe Sensitivität [Kaiser et al. 1993]. Dieses Verfahren macht sich die starke Vaskularisierung von Tumoren zu Nutze, welche im Rahmen der Tumorangiogenese auftritt. Die vom Tumor sezernierten Angiogenesefaktoren sind verantwortlich für die Bildung von zahlreichen tumoreigenen pathologischen Blutgefäßen. Sie ermöglichen eine für das Tumorstadium (ab 2 mm Durchmesser) essentielle, erhöhte Perfusion von Nährstoffen und den entsprechenden Abtransport von Stoffwechselprodukten [Folkman 1990]. Analog dazu wird durch die erhöhte Perfusion auch das Kontrastmittel Gadolinium-DTPA in der Frühphase (1-2 min) der intravenösen Injektion im malignen Gewebe selektiv im Tumor angereichert und erst im weiteren zeitlichen Verlauf in der ganzen Brust verteilt. In dieser Frühphase werden Magnetresonanzaufnahmen erstellt. In Abhängigkeit von Art und Weise und der Zeitdauer der Kontrastmittelanreicherung im tumorverdächtigen Areal können Aussagen über die Dignität gemacht werden. Vor allem für Mammakarzinome bis 10 mm im Durchmesser

sind Aussagen über die Dignität wichtig, da sie eine sehr günstige Prognose haben (Tabar et al. 1992) und bereits in diesem Stadium einer kurativen Therapie zugänglich gemacht werden sollten.

Von den Therapiemethoden ist die klassische Operation auch heute noch die Methode der ersten Wahl. Doch nicht immer wird ein Mammakarzinom durch Operation entfernt. Für einzelne Frauen ist die psychische Belastung einer Mastektomie (Entfernung der Brust) nicht ertragbar, und sie verweigern die Operation. Damit gehen sie ein hohes Risiko ein, ihr Leben stark zu verkürzen. In solchen Fällen, aber auch im Anschluß an eine Operation, sind Chemotherapie und/oder Strahlentherapie gängige Behandlungsmethoden. Beide Therapiearten belasten den Patienten durch starke Nebenwirkungen und schränken seine Lebensqualität ein. Je nach angewandtem Präparat und Strahlendosis gehören dazu Übelkeit und Erbrechen, Haarausfall, Entzündungen, Suppression der Knochenmarksfunktion oder degenerative Erscheinungen wie Narben [Wellhöner 1997, Felix et al. 1991].

Auf Grund dieser Tatsache werden prinzipiell alternative Methoden der Tumorbehandlung gesucht. Tendenziell wird vermehrt nach minimal-invasiven Behandlungsmöglichkeiten geforscht. Solche alternativen Behandlungsmöglichkeiten sind beispielsweise die Tumorembolisation, die perkutane Ethanolinjektion und die Kryoablation. Diese Verfahren werden unter anderem an Tumoren der inneren Organe erforscht und sollen an dieser Stelle kurz erläutert werden. Bisher ungeklärt ist, ob die genannten Methoden für die routinemäßige Anwendung in der Therapie des Mammakarzinoms geeignet sind, da in der Brust andere Bedingungen wie beispielsweise in der Leber vorherrschen.

Die Tumorembolisation wird vorrangig an Lebertumoren untersucht. Der Ast der Portalvene, der den Tumor primär mit Nährstoffen versorgt, wird embolisiert. Die Folge ist eine Atrophie des entsprechenden Leberlappens. Gleichzeitig wird der nichtembolisierte Teil der Leber zur Hypertrophie angeregt [Elias et al. 1999]. Dieser Therapieansatz weist jedoch kaum eine höhere 5-Jahresüberlebensrate im Vergleich zur klassischen Leberteilesektion auf.

Die Effektivität der percutanen Ethanolinjektion wurde bisher vorwiegend an primären und sekundären Lebertumoren sowie an Schilddrüsenknoten überprüft [Solymosi et al. 1999, Lin et al. 1999, Solbiati et al. 1999, Takayasu et al. 1999]. Mit Hilfe bildgebender Verfahren, wie Ultraschall oder Computertomographie, wird in ein zuführendes Gefäß direkt vor dem Tumor Ethanol injiziert. Auf diese Weise wird das Gefäßsystem des Tumors geschädigt, sklerosiert und somit die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr unterbunden. Nebenwirkungen dieser Methode können allerdings Blutungen und Gallenwegsp perforationen mit nachfolgender Peritonitis sein [Jacobi 1997].

Die Entwicklung der Kryotherapie weist bereits eine längere Geschichte auf. Um 1850 beschrieb der Engländer James Arnott den therapeutischen Effekt einer etwa -20°C kalten Salzlösung nach Applikation in Brust- und Cervixkarzinome [Gage 1998]. Daraufhin beobachtete er eine Tumorverkleinerung und Verminderung der Schmerzen seiner Patientinnen. Heutzutage wird eine durch flüssigen Stickstoff gekühlte Vakuumsonde in Tumore appliziert und der Gefrierungsprozeß mit bildgebenden Verfahren überwacht. Es ist möglich, große Tumorumfänge zu zerstören. Allerdings wurden intraoperative und postoperative Komplikationen beschrieben, einschließlich eines Todesfalles. Zu diesen Komplikationen gehören das Kälteschockphänomen, der Abfall der Thrombozytenzahl und aggressive Reaktionen des Immunsystems [Polk et al. 1995]. Die drei genannten Methoden haben noch keinen Eingang in die routinemäßige Anwendung in der allgemeinen Tumorthherapie gefunden.

Eine vielversprechende Alternative zur Behandlung von Brusttumoren ist die Nutzung von Wärme. Bereits vor unserer Zeitrechnung postulierte der griechische Arzt Parmenides: Hätte er die Möglichkeit, Fieber zu induzieren, so könnte er alle Krankheiten heilen [Hahn 1982]. Auch von Ardenne machte sich den therapeutischen Effekt von Wärme zunutze. Im Jahr 1965 stellte er seine Multisteptherapie vor, wonach eine Sauerstoff- und Glukosegabe bei einer Temperaturerhöhung des gesamten Körpers auf $41-42^{\circ}\text{C}$ für 60-90 min erfolgt [M. von Ardenne 1994]. Dabei erhöht Sauerstoff die Stresstoleranz einer normalen Zelle, Glukose gibt zusätzlich dem durch die zugeführte Wärme hochgesetzten Zellmetabolismus Energie. Eine Krebszelle hingegen nutzt das vermehrte Sauerstoffangebot kaum. Die Glukose wird zu Laktat vergoren. Folglich sinkt der pH-Wert der Tumorzelle, und sie wird somit wärmeempfindlicher. Von Ardenne schützt mit diesem Verfahren gesunde Zellen, während Tumorzellen angreifbarer werden [Steinhausen et al. 1994, Pohlers et al. 1994]. Auf diese Weise konnte von Ardenne einigen Patienten im Endstadium maligner Erkrankungen das Leben um Jahre verlängern [A. von Ardenne 1997]. Jedoch erfordert die Therapie von bereits geschwächten Patienten ein großes Durchhaltevermögen und eine hohe Stresstoleranz. Erytheme und Übelkeit nach der Behandlung wurden beschrieben [M. von Ardenne et al. 1994]. Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Niereninsuffizienz, respiratorischer Insuffizienz und Zustand nach Schlaganfall ist diese Therapie nicht zugänglich [Von Ardenne Klinik, Dresden 1997].

Inzwischen beschäftigt sich eine Vielzahl von Wissenschaftlern mit der Erhöhung der Körpertemperatur um einige Grad Celsius, der sogenannten Hyperthermie, zur Bekämpfung maligner Erkrankungen. Auffällig hierbei ist die unterschiedliche Definition der Hyperthermie in Abhängigkeit von der systemischen oder lokalen Anwendung. Von Ardenne strebte Temperaturen zwischen $41-42^{\circ}\text{C}$ an, Seegenschmiedt et al. verwendeten Temperaturen von $40,5-$

44°C [Seegenschmiedt et al. 1996], Madersbacher et al. sprechen bei Temperaturen zwischen 45-47°C von Hyperthermie [Madersbacher et al. 1996]. Im klinischen Wörterbuch Pschyrembel kann folgende Definition gelesen werden: „Hyperthermie ist eine Erhöhung der Körpertemperatur ohne Veränderung der Regelgröße“ [Pschyrembel 1994]. Jordan faßte sinngemäß die verschiedenen Definitionen zusammen: Hyperthermie ist die Erwärmung von Organen und Geweben auf Temperaturen zwischen 41-46°C zur Therapie von Tumoren [Jordan et al. 1999].

Die Wirkung der Hyperthermie auf Tumorzellen wurde in verschiedenen In-vitro-Versuchen untersucht. Beispielhaft sei hier die In-vitro-Untersuchung von Willnow et al. dargestellt [Willnow et al. 1996]. Die Autoren untersuchten die alleinige Wirkung einer Erwärmung auf 42,5°C über 120 min, verschiedener Zytostatika und die Kombination von Hyperthermie und Zytostatika auf embryonale Tumorzellen und Sarkomzellen. Die Forschungsgruppe kam zu dem Ergebnis, daß Hyperthermie die DNA- und RNA- Synthese hemmt und die Wirkung einiger Zytostatika verstärkt (z. B. Adriamycin, Daunomycin, Cyclophosphamid, cis-Platinum). Bei gleichzeitiger Anwendung von Hyperthermie und Zytostatika ist die Wirkungssteigerung mehr als additiv. In-vivo-Versuche bestätigten diese Ergebnisse [Madersbacher et al. 1998, Urano et al. 1999, Brücker et al. 1999, Mauroy et al. 1999]. Auf Grund dieser Erkenntnisse wird in der klinischen Anwendung die Hyperthermie oft mit zytostatischer Therapie, zum Beispiel mit alkylierenden Zytostatika, kombiniert [Romanowski et al. 1993]. Ebenso wurde die Kombination von Hyperthermie mit Radiotherapie erforscht [Peschke et al. 1998] und bereits in klinischen Studien angewendet [Seegenschmiedt et al. 1996].

Dennoch bewirken therapeutische Temperaturen unter 47°C nicht immer eine irreversible Gewebeschädigung [Madersbacher 1996]. Nur die Kombination der Hyperthermie mit Radio- oder Chemotherapie bewirkt durch eine additive Wirkung eine irreversible Tumorzellschädigung [Journée-de Korver et al. 1995]. Im Gegensatz zur Hyperthermie beansprucht die Thermoablation definitionsgemäß Temperaturen über 47°C [Jordan et al. 1997]. Sie bietet im Idealfall die Möglichkeit, die Kombination mit Chemo- oder Radiotherapie an einem ausgewählten Patientenkollektiv mit kleinen Tumoren und negativem Lymphknotenstadium zu umgehen, da lokal Temperaturen im Tumorgewebe von bis zu 100°C möglich sind. Verglichen mit der Hyperthermie haben diese hohen Temperaturen eine sehr starke zytotoxische Wirkung. Die Tumorzellen werden allein durch Wärme irreversibel geschädigt. Wärme kann über verschiedene Methoden, wie beispielsweise Radiofrequenzen, Mikrowellen, Laser oder Ultraschall, appliziert werden. Diese Verfahren werden zur Zeit experimentell und an ausgewählten Patientenkollektiven mit zumeist Abdominaltumoren erprobt.

Bei der sogenannten Radio-Frequency Thermoablation (RITA), auch High Frequency Thermoablation (HFTT) genannt, wurden bisher hauptsächlich Untersuchungen an Lebertumoren sowie vereinzelt auch an Lungen- und Brustgewebe durchgeführt. Hier wird unter Ultraschallbildgebung eine zur Elektrode modifizierte Nadel in den Tumor eingebracht. Mit Hilfe dieser Nadel und einer Referenzelektrode wird ein elektrisches Feld aufgebaut und lokale ionische Bewegungen im Tumorgewebe erzeugt. Durch Reibungsverluste kommt es zur Erhitzung des tumorösen Gewebes. Die Applikationsdauer variiert zwischen 1 und 25 min, die realisierte Temperatur im Tumorareal liegt um die 90°C. Als Ergebnis werden Tumornekrosen und danach Tumorregressionen beobachtet. Der Effekt kann in der Leber durch eine um die Elektrode gespülte Salzlösung und somit stärkere Ionenbewegung verstärkt werden. Wegen auftretender Karbonisationen und daraus folgenden Gewebsverklebungen mit der Elektrodennadel wurden gekühlte Nadelspitzen entwickelt, wobei die Nadel in einen distalen erwärmenden und proximal gekühlten Bereich unterteilt wird. Das tumorfreie Überleben nach der Behandlung mit dieser Methode liegt zwischen 50% nach einem Beobachtungszeitraum von 17 Monaten und 25% nach einem Beobachtungszeitraum von 40 Monaten (Tumordurchmesser 6-75 mm). Allerdings kann bei einer übermäßigen Energiezufuhr Gewebe verdampfen, und gasförmige Nebenprodukte sowie Mikroblassen können sich in das gesunde Gewebe oder das Gefäßsystem verflüchtigen. Von Fällen einer selbstlimitierten intraperitonealen Blutung, Schmerzen und Unwohlsein wurde berichtet [McGahan et al. 1990, Solbiati et al. 1997, Livraghi et al. 1997, Solbiati et al. 1997, Rossi et al. 1993, Goldberg et al. 1996, Böhm et al. 2000, Böhm et al. 2001].

Auch bei der Applikation von Wärme durch Mikrowellen wird eine Nadel verwendet. Hier wird die Temperatur durch die Bewegung molekularer Dipole erzeugt. Bisher wurde die Methode vorrangig an Prostatatumoren erprobt [Larson et al. 1998, Lancaster et al. 1999].

Die laserinduzierte Thermotherapie wurde bereits in der Behandlung von Tumoren im Kopf-, Gehirn-, Leber-, Hals- und Abdomenbereich angewendet. Ein spezieller Laserapplikator wird mittels Punktion in das pathologische Gewebe eingebracht. Die durch den Applikator diffus abgestrahlte Laserlichtenergie wird durch das umgebende Tumorgewebe absorbiert und führt zu einer lokalen Temperaturerhöhung. Roggan et al. [1999] erwähnen sogar eine Geweberwärmung mit dieser Methode bis auf 150°C. Die Applikationsdauer beträgt bis zu 25 min [Roggan et al. 1999]. Eine Effizienzsteigerung läßt sich mit der Positionierung mehrerer Applikatoren in einem Tumor erreichen.

Die Behandlung von Tumoren durch Thermoablation mittels magnetischer Methoden verspricht eine verfeinerte Kontrolle der Temperatur, sodaß vorraussichtlich eine Gasbildung und Karbonisation des Gewebes vermieden und eine bessere Fokussierung der Wärme im

Tumorareal zum Schutz des gesunden Gewebes möglich wird. Das Prinzip beruht auf der selektiven Applikation von Eisenoxid (speziell Magnetit, Fe_3O_4) in den Tumor. Anschließend wird ein magnetisches Wechselfeld angelegt, wobei das magnetische Material aus dem Magnetwechselfeld Energie absorbiert, in Wärme umwandelt und somit das maligne Gewebe zerstört.

Das Prinzip der Methode wurde erstmals von Gilchrist et al. [1957] vorgeschlagen, erste Untersuchungen wurden von Gordon et al. [1979], Luderer et al. [1983], Rand et al. [1981] und Chan et al. [1993] an verschiedenen Tiermodellen veröffentlicht. Die gemessenen Temperaturen am Zielort lagen zwischen 43°C und 50°C bei Expositionszeiten von mehr als 12 min. Im Gegensatz dazu werden bei der magnetischen Thermoablation kurze Expositionszeiten (4 min) bei hohen Temperaturen (über 50°C) angestrebt [Hilger et al. 2000, Hilger et al. 2001].

Die selektive Applikation des Magnetits kann mittels Bildgebung und Nadelinjektion intratumoral erfolgen. Dabei wird erwartet, daß das Magnetit zunächst einige Minuten im Tumor verbleibt, bevor es durch das zirkulierende Blut ausgewaschen wird. Während dieser Zeit kann ein magnetisches Wechselfeld angelegt werden, ohne gesundes Gewebe zu erwärmen und zu zerstören.

Das zu verwendende Magnetit sollte eine Reihe verschiedener Bedingungen zum reibungslosen Ablauf des Verfahrens erfüllen. Dazu gehören die Sterilität des Magnetites, eine sehr geringe Toxizität und somit gute Biokompatibilität. Zur selektiven Applikation sind Ferrofluide geeignet. Ferrofluide sind Eisenoxidpartikel (Magnetite), die durch eine organische Hülle in einer flüssigen Matrix in Suspension gehalten werden. Die Ferrofluide sollten ein möglichst hohes spezifisches Wärmepotential (spezifische Absorptionsrate (SAR)) aufweisen, um das zu applizierende Volumen der Eisenoxidsuspension zu minimieren. Die spezifische Absorptionsrate ist die aufgrund magnetischer Verluste erfolgende Temperaturänderung innerhalb einer bestimmten Zeit bezogen auf eine definierte Masse an Eisenoxid [K. Frühauf 2001].

Grundsätzlich steht eine breite Palette an verschiedenen Magnetitproben zur Verfügung. Die Hersteller von Eisenoxiden (speziell Magnetit (Fe_3O_4)) verfolgen meist unterschiedliche Ziele. So werden Magnetitteilchen bzw. Ferrofluide für den technischen Gebrauch, beispielsweise für magnetische Kupplungen [Schwender 1999], aber auch für medizinische, biologische und biochemische Anwendungen hergestellt [Günther 1996]. Je nach angestrebtem Zweck variieren die Magnetitpartikel in ihrer Größe und Partikelform sowie in der Zusammensetzung ihrer organischen Hüllen. Vor allem für Anwendungen der Magnetitpartikel im biologisch-medizinischen Bereich stellt die Sterilität der Magnetitpartikel eine Grundvoraussetzung dar. Das Sterilisationsverfahren des Kontrastmittels Endorem für die Magnetresonanztomographie ist

bekannt. Es wird bei 121°C über 30 min autoklaviert [Peters 2001]. Auf Grund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Ferrofluide bzw. des unterschiedlichen Aufbaus der organischen Hüllen der Eisenoxidpartikel kann dieses Verfahren jedoch nicht ohne weiteres auf die Sterilisation von Ferrofluiden übertragen werden. Grundsätzlich stehen verschiedene Verfahren der Sterilisation zur Verfügung. Dazu gehören die chemische Sterilisation, die Sterilisation mittels ionisierender Strahlen, die Sterilfiltration und die Autoklavierung. Bei allen genannten Methoden kann es zu einer Zerstörung der empfindlichen organischen Hüllen der Magnetitpartikel kommen. Je nach Sterilisationsmethode sind Reaktionen der organischen Hüllen mit teils toxischen Sterilisationssubstanzen, mit radioaktiven Teilchen, mit elektromagnetischen Wellen oder durch lange Hitzeexposition denkbar. Daher gilt es, durch die Modifizierung einer der oben genannten Sterilisationsverfahren einen Beitrag zur Etablierung einer Methode zur Sterilisation von interessanten Ferrofluiden zu leisten.

Im Hinblick auf die Verwendung von umhüllten Magnetitpartikeln in der vorgeschlagenen Therapiemethode ist ihre Fähigkeit zur Anlagerung an die Zellmembran interessant. Diese Fragestellung ist in bezug auf die Temperaturmodellierung am Tumorort von Bedeutung. Hierbei spielen die Morphologie und die Mechanismen der Wärmeentwicklung bei Einwirkung eines magnetischen Wechselfeldes unter verschiedenen Bedingungen eine Rolle. Sie sind aus mehreren Studien bekannt. So überprüften Hergt et al. [1998] die Hysterese- und Relaxationsverluste sowie die daraus folgende Temperatursteigerung unterschiedlicher Eisenoxide mit verschiedener Partikelstruktur im magnetischen Wechselfeld. Danach ist das Wärmepotential von der Partikelgröße, Partikelform und Mikrostruktur der Eisenoxidteilchen abhängig. Andrä et al. [1998] ermittelten die SAR unterschiedlicher Eisenoxide. K. Frühauf [2001] wies eine unterschiedliche Erwärmung von Magnetiten im Magnetfeld in Abhängigkeit des Aggregatzustands der Trägersubstanz nach. Bisherige Untersuchungen mit Magnetitteilchen in verschiedenen Gelmatrixen zeigen, daß die SAR von der Beweglichkeit der Teilchen abhängig sein kann. Bei größeren Magnetitteilchen (>350 nm) fand K. Frühauf [2001] im festen Agar eine deutlich verminderte SAR verglichen mit einer Suspension in flüssigem Agar oder Wasser. Dieser Effekt wird durch die eingeschränkte freie Beweglichkeit der Teilchen im festen Medium erklärt, d. h. es tritt eine geringere Wärmeproduktion durch Reibungsverluste auf. Die kleineren superparamagnetischen Teilchen (ca. 50 nm) werden im Magnetwechselfeld vorwiegend durch einen Prozeß erwärmt, der als Néelsche Relaxation bezeichnet wird und Ummagnetisierungsverluste beschreibt. Nach den Ergebnissen von K. Frühauf [2001] ist die Néelsche Relaxation nicht signifikant vom Aggregatzustand des Mediums abhängig.

In Analogie zu den oben dargestellten Zusammenhängen können Magnetitteilchen durch Wechselwirkungen mit extrazellulären Matrixkomponenten, zum Beispiel Rezeptoren der Zellmembran, fixiert werden und gegebenenfalls eine Verminderung der SAR bewirken.

Grundlage zur gezielten Erforschung dieses Sachverhalts ist also die Kenntnis der Anlagerung der einzelnen Magnetitpartikel an die Zellmembran. Ob sich Magnetitpartikel konkret an die Zellmembran von Zellen einer ausgewählten humanen Adenokarzinomzelllinie anlagern, soll in den vorliegenden Untersuchungen geklärt werden.

Über die Einsatzmöglichkeiten von Magnetitpartikeln im biochemisch-medizinischen Bereich gibt es bereits erste Veröffentlichungen. Beispielsweise findet Magnetit im Kontrastmittel Endorem für Magnetresonanzaufnahmen Anwendung [Laboratoire Guerbet 1994]. Es dient zum Nachweis von fokalen Leberläsionen und ist laut Testergebnissen gut verträglich [Laniado et al. 1995]. Bergemann [2000] markierte Erythrozyten mit durch eine Stärkehülle modifizierten Eisennanopartikeln. Des weiteren wies er in In-vitro- und In-vivo-Experimenten die Eignung der Eisennanopartikel als Trägersubstanz (Drugcarrier) von Arzneimitteln (z.B. das Zytostatikum Epirubicin) nach, wenn diese zuvor mit endständigen DEAE-Gruppen (Diethylaminoethyl-Gruppen) versehen wurden. [Bergemann et al. 1999, Lübke et al. 1996]. Die Anwendung von Eisenoxiden im biologisch-medizinischen Bereich bestätigen auch Jordan et al. [1996 und 1997]. Die Arbeitsgruppe führte Untersuchungen mit Eisenoxiden im Bereich der Hyperthermie an menschlichen Adenocarcinomzellen und an Mäusen durch.

Dennoch kann auf Grund der unterschiedlichen Eigenschaften der organischen Hüllen nicht prinzipiell von einer guten Verträglichkeit der Eisenoxide bzw. Ferrofluide ausgegangen werden. So führten Lacava et al. [1999] In-vivo-Versuche an Mäusen mit Eisenoxidpartikeln durch, die Tartrate bzw. Citrate in der Hülle enthielten. Die verwendeten Eisenoxidpartikel wiesen mutagene Eigenschaften auf. Die Kenntnis über den zytotoxischen Einfluß von Magnetiten im Bereich der magnetischen Thermoablation ist wichtig, wenn Magnetitteilchen, durch Eliminationsvorgänge das Tumorgewebe verlassen und mit gesunden Zellen in Berührung kommen. In diesem Fall sollte eine Zytotoxizität der verwendeten Magnetite ausgeschlossen werden können. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit in Vorbereitung auf Experimente mit Zellen im Magnetwechselfeld ist daher Magnetite zu finden, die für In-vitro-Versuche an Zellen geeignet sind.

In-vitro-Versuche mit Muskel- und Lebergewebe belegen, daß sowohl mittels der magnetischen Thermoablation innerhalb von 2-4 min Temperaturdifferenzen von bis zu 35°C erreicht werden können, als auch, daß die Temperatur mit wachsendem Abstand zur Magnetitdeposition rasch abfällt [Hilger et al. 1997]. Anhand dieser Untersuchungen ist bei der Applikation des Magnetits

im Zentrum des Tumors eine Temperaturluckenkurve zu erwarten. Bisher unklar ist die kritische Temperatur, die am Tumorrand erreicht werden muß, um den Tumor sicher zu zerstören. Um diese Fragestellung zu klären, sind Zellexperimente im Wasserbad wegen des geringen technischen Aufwandes günstig, die durch Versuche im Magnetwechselfeld ergänzt werden.

Die Effektivität der Erwärmung von Zellen im Magnetwechselfeld im Vergleich zur Erwärmung im Wasserbad überprüften Chan et al. [1993] und Jordan et al. [1999] in ihren Arbeiten an Zellen. Wie ihre Ergebnisse zeigen, gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der irreversiblen Schädigung von Zellen verursacht durch Erwärmung im Wasserbad und Erwärmung mittels Eisenoxidpartikeln im Magnetfeld. Sie zeigten auch, daß das Magnetwechselfeld (155 kHz-1,1 MHz; 6,84-12,86 kA·m⁻¹) an sich keinen schädigenden Einfluß auf die Vitalität der Zellen hat. Allerdings führten die oben genannten Arbeitsgruppen ihre Versuche nur für den Bereich der Hyperthermie, d. h. für Temperaturen von 42°C bis 45°C und lange Expositionszeiten (>15 min), durch. Sehr wahrscheinlich ist, daß eine klassisch induzierte Überwärmung durch magnetische Thermoablation im Bereich von Temperaturen >50°C über einen kurzen Zeitraum von 4 min tendenziell den gleichen Effekt auf die Zellvitalität aufweist wie eine Temperaturerhöhung durch Wasserbad. Nach der bisherigen Datenlage gibt es jedoch nur histologische Untersuchungen zur Zellschädigung durch magnetische Thermoablation, die direkt nach der Behandlung durchgeführt worden sind [Hilger et al. 2001]. Aus diesen Untersuchungen läßt sich eine irreversible Schädigung der Tumorzellen nicht sicher ableiten.

Unter Berücksichtigung der aufgeführten Gesichtspunkte wurden in der vorliegenden Studie folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Die Sterilisierung von ausgewählten Magnetitproben
2. Untersuchungen zu Wechselwirkungen von umhüllten Magnetitpartikeln mit der Zellmembran einer Tumorzelle
3. Bestimmung der kritischen Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Tumorzellen durch Exposition im Wasserbad (4 min)
4. beispielhafte Erwärmung von Tumorzellen durch magnetische Thermoablation mit vorbereitenden Zytotoxizitätsuntersuchungen der zu verwendenden Magnetite

2. Arbeitsutensilien

2.1 Lösungen und Chemikalien

- *Anti- β -Tubulin (Roche; Mannheim, Deutschland)
- *Anti-Maus IgG-FITC (Fluorescein Isothiocyanate), (Roche; Mannheim, Deutschland)
- *Aceton (Sigma-Aldrich; München, Deutschland)
- *Agarböden (Blutagar, Winkleagar, Sabaroundagar), hergestellt im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland
- *Aqua dest. (Fresenius; Bad Homburg, Deutschland)
- *Blocklösung: Die Blocklösung wurde aus 9,9 ml PBS, 0,1 ml FKS (Fetales Kälberserum) und 0,01 g BSA (Bovine Serum Albumin) hergestellt.
- *BSA (Bovine Serum Albumin), (Sigma-Aldrich; München, Deutschland)
- *Eis
- *Eisessig (Sigma-Aldrich; München, Deutschland)
- *Ethanol vergällt in Aqua bidest. 70% (v/v) (Euroalkohol; Nordhausen, Deutschland)
- *Ferrofluide: Probe 1: EMG 705 (Ferrofluidics; Nürtingen, Deutschland)
Probe 2: EMG 605 (Ferrofluidics; Nürtingen, Deutschland)
Probe 3: EMG 1111 (Ferrofluidics; Nürtingen, Deutschland)
Probe 4: M 348 (Chemagen Colloids; Berlin, Deutschland)
Probe 5: M 349 (Chemagen Colloids; Berlin, Deutschland)
Probe 6: B 5 (Dr. Buske, Berlin, Deutschland)
- *FKS (Fetales Kälberserum) (GIBCOBRL; Karlsruhe, Deutschland)
- *FITC (Fluoreszein Isothiocynat) 1:200 mit Blocklösung verdünnt (Roche; Mannheim, Deutschland)
- *Giemsa-Lösung in Aqua bidest. 5%ig (v/v), (Sigma-Aldrich; München, Deutschland)
- *Glutaraldehyd 3%ig (v/v) in PBS gelöst (Agar scientific LTD, Stansted/Essex, Großbritannien)
- *Kit zur Bestimmung von Mykoplasmenbefall in der Zellkultur (Biochrom; Berlin, Deutschland) bestehend aus:
 - Carnoy's Fixierlösung (Methanol : Eisessig = 3 : 1)
 - Färbelösung (Bisbenzimidazol)
 - Eindecklösung (Citronensäure-Phosphatpuffer)
 - Negativ- und Positivkontrolle

*Kulturmedium (GIBCOBRL; Karlsruhe, Deutschland)

Zu je 500 ml MEM-Basismedium (GIBCOBRL) wurden 50 ml FKS (GIBCOBRL) und 5 ml Na-Pyruvat 100 mM (GIBCOBRL) als Zusatz gegeben.

*Methanol 96% (v/v) (Sigma-Aldrich; München, Deutschland)

*Natrium-Pyruvat 100 mM (GIBCOBRL; Karlsruhe, Deutschland)

*PBS (Eigenherstellung)

Zur Herstellung des Puffers PBS wurden 13,61 g KH_2PO_4 für die Lösung A (Säure) und 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ für die Lösung B (Base) in jeweils 1000 ml Aqua bidest. gelöst. Ein Teil von Lösung A wurde mit vier Teilen von Lösung B gemischt, so daß sich der pH-Wert des Puffers auf 7,38 einstellte. Dies wurde mit einem pH-Meter überprüft.

*Permafluor (Immunotech; Hamburg, Deutschland)

*Trypanblaustamlösung 1:5 in PBS (Sigma-Aldrich; München, Deutschland)

*Trypsin-EDTA (GIBCOBRL; Karlsruhe, Deutschland)

(0,5 g Trypsin (1:250) und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter Puck's Salzlösung)

2.2 Materialien

*Bechergläser (Schott; Mainz, Deutschland)

*BT-20 Zellen (Krebsforschungsinstitut Heidelberg, Deutschland)

*Kryoröhrchen 1,8 ml (Greiner; Solingen, Deutschland)

*Deckgläschen 24*50 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)

*Eppendorf-Gefäße 1,5 ml (Eppendorf; Köln, Deutschland)

*Falcontubes, verschließbares Plastikröhrchen für 50 ml Inhalt (Greiner; Solingen, Deutschland)

*Kammerobjektträger 21,6*45,7 mm (Chamber SlideTM); (Nunc; Wiesbaden, Deutschland)

*Kammerobjektträger mit 16 Kammern à 36 mm² (Chamber SlideTM); (Nunc; Wiesbaden, Deutschland)

*Meßzylinder bis 100 ml, 200 ml, 500 ml Volumen (Scherf^a Präzision; Meiningen, Deutschland)

*Pasteurpipetten; 230 mm (Volac; Barking, Essex, Großbritannien)

*Petrischalen á 8 cm² Wachstumsfläche (Nunc; Wiesbaden, Germany)

*Pipetten (Assistent; Sondheim-Rhön, Deutschland)

*Plasteständer für Reagenzgläser (Kartell^R; Noviglio, Italien)

*Plasteständer für Tubes (Neolab; Berlin, Deutschland)

*Reagenzgläser (Assistent; Sondheim-Rhön, Deutschland)

- *Thomakammer (Nunc; Wiesbaden, Deutschland)
- *Watte (Lilibe; Burgwedel, Deutschland)
- *Zellkulturflaschen; 25 cm², 75 cm², 175 cm² Wachstumsfläche (Nunc; Wiesbaden, Deutschland)

2.3 Geräte

- *Abzug (Köttermann; Uetze/Hänigsen, Deutschland)
- *Accu-Jet (Nunc; Wiesbaden, Deutschland)
- *Brutschrank Hera cell (Heraeus; Berlin, Deutschland)
- *Bunsenbrenner (Heraeus; Berlin, Deutschland)
- *Computer, IBM-kompatibel (Compaq; Dornach, Deutschland)
- *Dewargefäß (KGW Isotherm; Karlsruhe, Deutschland)
- *Digitalmultimeter 2000 Multimeter (Keithley; Germering; Deutschland)
- *Elektronenmikroskop EM 900 und EM 902 A (Carl Zeiss; Jena, Deutschland)
- *Fluoreszenzmikroskop BX 50, Filter 470-490 nm (Olympus; Hamburg, Deutschland)
- *Generator zur Induktion von magnetischen Wechselfeldern, Frequenz 400 kHz, Amplitude 6,5 kA*m⁻¹ (EFD; Düsseldorf, Deutschland)
- *Induktor mit Spule, Typ HFP 061/05 (EFD; Düsseldorf, Deutschland)
- *Kryo-Behälter GT 38 (L'AIR LIQUIDE S.A.; Düsseldorf, Deutschland)
- *Kryo-Einfrierbehälter (Merck; Berlin, Deutschland)
- *Phasenkontrastmikroskop Typ C 40 (Olympus, Hamburg, Deutschland)
- *pH-Meter HI 9024 (Hanna instruments; Kehl, Deutschland)
- *Pipettierhilfen bis 100 µl, 200 µl, 1000 µl (Eppendorf; Köln, Deutschland)
- *Sigmaplot 3.0 (Jandel scientific; Middle Cove, Australien)
- *Stativ (Merck; Berlin, Deutschland)
- *Stereolupe SM 20 (Carl Zeiss; Jena, Deutschland)
- *Testpoint (Jandel; Middle Cove, Australien);
zur Verfügung gestellt durch das Institut für Physikalische Hochtechnologie Jena
- *Thermoelement (Eigenherstellung)
- *Thermostat Typ TB 25 (mLw; Medingen, Deutschland)
- *Ultraschallbad (Bandelin; Berlin, Deutschland)
- *Ultraschallbad RK 52 H (Sonorex; Miami, USA)
- *Wasserbad 1052 (GFL; Burgwedel, Deutschland)
- *Werkbank Hera safe (Heraeus; Berlin, Deutschland)

3. Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle hier beschriebenen Experimente 3 mal durchgeführt mit Ausnahme der Cytoskelettdarstellung, welche nur einmal durchgeführt wurde.

3.1 Sterilisierung von Ferrofluiden

3.1.1 Charakterisierung der Ferrofluide

Nachfolgende Tabelle 1 zeigt bekannte Charakterisierungsmerkmale der einzelnen verwendeten Ferrofluidproben. Ferrofluide sind Eisen(II, III)-oxide bzw. Magnetitpartikel, die kolloidal in einer flüssigen Matrix suspendiert sind.

Tab. 1: Charakterisierungsmerkmale der in dieser Studie verwendeten Ferrofluide

Proben nummer	Firmeninterne Bezeichnung	Charakteristika der einzelnen Ferrofluide
Magnetitprobe 1	EMG 705	Magnetitpartikel (Fe_3O_4) in kolloidaler Lösung umgeben von einer organischen Hülle mit negativer Oberflächenladung Partikelgröße: 10 nm [Tatarunis 1999] Massenprozent Magnetit: 21% [K. Frühauf 2001]
Magnetitprobe 2	EMG 605	Magnetitpartikel in kolloidaler Lösung umgeben von einer organischen Hülle mit positiver Oberflächenladung Partikelgröße: 10 nm [Tatarunis 1999] Massenprozent Magnetit: 19,3%
Magnetitprobe 3	M348	Magnetitpartikel in kolloidaler Lösung umgeben von einer organischen Hülle mit endständigen DEAE-Gruppen und Anionenaustauscherkapazität Partikelgröße: 220 nm [Bergemann 1999] Massenprozent Magnetit: 4,3%
Magnetitprobe 4	M349	Magnetitpartikel in kolloidaler Lösung umgeben von einer organischen Hülle mit endständigen DEAE-Gruppen und doppelter Anionenaustauscherkapazität im Vergleich zu Magnetitprobe 3 Partikelgröße: 220 nm [Bergemann 1999] Massenprozent Magnetit: 3,8%
Magnetitprobe 5	B 5	Magnetitpartikel in kolloidaler Lösung in Wasser umgeben von einer Dextranhülle pH-Wert: 6,9 Partikelgröße: unbekannt Massenprozent Magnetit: 6,1%

3.1.2 Sterilisation der Ferrofluide

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Ferrofluide in In-vitro-Zellkulturexperimenten war deren Sterilität. In Anbetracht der unbekannten Thermostabilität der Ferrofluide wurde versucht, die Sterilisation unter schonenden Bedingungen durchzuführen. Die Autoklavierung und Bebrütung der Nährböden erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie.

Die verschiedenen Magnetitproben wurden bei 121°C und 200 kPa autoklaviert. Die Zeitspanne der Sterilisierung betrug 0 min und 5 min. Bei 0 min wurden die Magnetitproben auf 121°C erwärmt und sofort wieder abgekühlt (Momentautoklavierung). Anschließend wurden die Magnetitproben auf makroskopisch sichtbare Veränderungen (Verklumpung, Zähigkeit) überprüft. Zum Nachweis der Sterilität wurden die Magnetitproben nach der Autoklavierung auf verschiedenen Agarböden ausgestrichen. Blutagar diente zum Nachweis von aeroben Bakterien, Sabaroundagar mit Chloramphenicolzusatz zum Nachweis von Pilzen und Winkleagar zum Nachweis von gramnegativen Bakterien. Die Agarböden wurden bei 37°C für 7 Tage bebrütet. Die Menge der Ferrofluide reichte von 100 µl bis 400 µl. Sie wurde bei jeder einzelnen Magnetitprobe auf die zum Erreichen einer definierten Zieltemperatur innerhalb 4 min im Magnetwechselfeld benötigte Menge festgelegt (Punkt 3.4). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die einzelnen Ferrofluidmengen, Sterilisationszeiten und Sterilisationstemperaturen.

Tab. 2: Sterilisierungsdaten der Ferrofluidproben 1-5 (siehe Tab. 1) mit Angaben über die Sterilisationstemperatur, die Sterilisationszeit und die zu sterilisierenden Probenvolumina; 0 min entspricht einer Momentautoklavierung

Sterilisationsbedingungen	Magnetitprobe	Ferrofluidvolumina
121°C; 0 min	1	100 µl
	2	100 µl
	3	400 µl
	4	400 µl
	5	400 µl
121°C; 5 min	1	100 µl
	2	100 µl
	3	400 µl
	4	400 µl
	5	400 µl

3.2 Wechselwirkungen zwischen Zellmembran und Magnetitpartikeln

3.2.1 Arbeiten mit Zellen

Für alle Versuche wurden Zellen der Linie BT-20 verwendet. Die Zellen stammen von einer 74jährigen kaukasischen Frau und wurden von Lasfargues etabliert [Lasfargues 1958]. Sie werden in die Gruppe der unspezifischen dukalen Mammakarzinome eingeordnet. Charakteristisch für diese Zelllinie sind negative Östrogenrezeptoren sowie eine Wachstumshemmung durch den Tumornekrosefaktor alpha. Abbildung 1 zeigt die typische Zellmorphologie der Zelllinie BT-20. Prinzipiell wurde bei geöffneten Kulturflaschen oder Petrischalen unter der Werkbank gearbeitet.

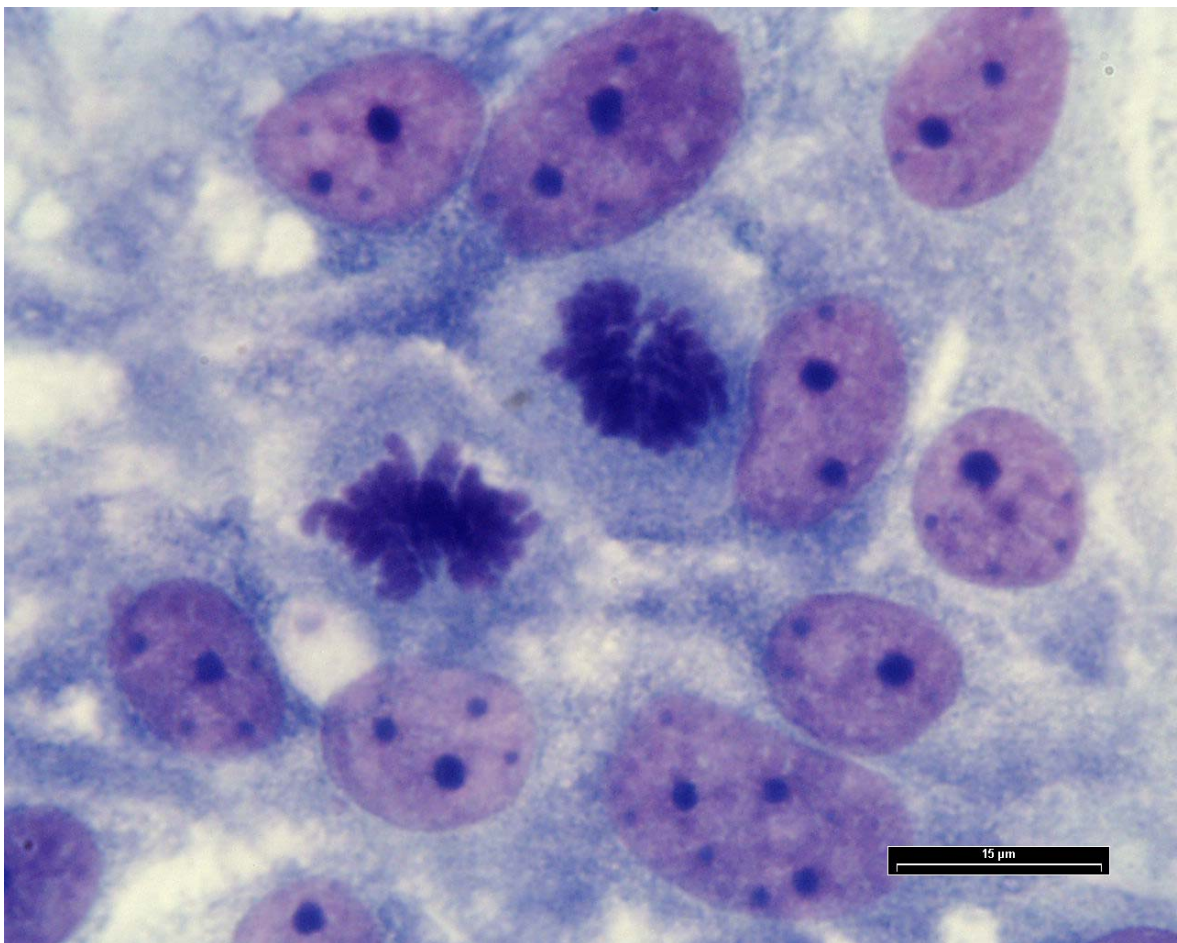


Abb. 1: Morphologie von BT-20-Zellen im Zellverband, in der Bildmitte ist eine Mitose erkennbar; Giemsafärbung; Meßbalken: 15 µm

3.2.1.1 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zum Auftauen wurden die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37°C erwärmt und sofort nach dem Auflösen des letzten Kristalls unter der Werkbank mit Kulturmedium versetzt sowie in Kulturgefäße übertragen.

Sollten Zellen eingefroren werden, wurde 1 ml einer Zellsuspension (zwischen $1 \cdot 10^7$ und $2,7 \cdot 10^7$ Zellen) in ein Kryoröhrchen pipettiert. Das Einfriermedium bestand zu 8% aus DMSO (Dimethylsulfoxid). Das Röhrchen wurde in ein Kryoeinfrierbehältnis gegeben, welches mit 250 ml Isopropanol gefüllt war. Die Zellen verblieben dort für 10-15 min bei 4°C. Für die folgenden 48-72 h wurden die Zellen stufenweise auf -70°C heruntergekühlt. Laut Angabe des Herstellers beträgt die Abkühlrate unter diesen Bedingungen 1°C pro Minute. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

3.2.1.2 Standardkulturbedingungen

Die Zellen wurden in 8 cm² (Wachstumsfläche) Petrischalen bzw. in 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² Kulturflaschen gezüchtet. Pro Petrischale wurden sie mit 1,5 ml Kulturmedium sowie pro Kulturflasche mit 5 ml, 15 ml bzw. mit 30 ml Kulturmedium versehen. Die Aussaatdichte wurde den unterschiedlichen Fragestellungen angepaßt. Ein Mediumwechsel erfolgte je nach Zelldichte alle 2-4 Tage. Alle Zellansätze wurden in einem Brutschrank bei 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C kultiviert.

3.2.1.3 Ernten und Passagieren der Zellen

Die Methode wird am Beispiel einer 25 cm² Kulturflasche dargestellt. Alle Mengenangaben für die anderen Flaschengrößen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Als erster Schritt wurde die Morphologie der Zellen und die Dichte der Zellpopulation unter einem Phasenkontrastmikroskop betrachtet und beurteilt. Unter der Werkbank wurde dann das Kulturmedium abpipettiert und verworfen. Nachfolgend wurde 3 mal mit jeweils 3 ml PBS gespült, wobei die Flasche zur besseren Verteilung leicht geschwenkt wurde. Anschließend wurden die Zellen enzymatisch von der Platematrix durch Zugabe von 0,5 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Zur Beschleunigung des Vorgangs wurde die Kulturflasche für ca. 5 min in den Brutschrank (37°C) gestellt. Nachfolgend wurden die Zellen mit 2 ml Kulturmedium suspendiert und in einem sterilen Falcontube bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gestellt. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 100 µl Trypanblaulösung vermischt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Thomakammer. Je nach Fragestellung wurde die Zellsuspension für Experimente verwendet oder in eine neue Kulturflasche ausgesät.

Tabelle 3: Arbeitsschritte zum Ernten und Passagieren von Zellen; Angaben der verwendeten Mengen an Kulturmedium, PBS und Trypsin-EDTA für verschiedene Kulturflaschengrößen

Kulturbedälter mit Wachstums- fläche	Kulturmedium- menge pro Kulturflasche	PBS-Menge zum Spülen	Trypsin-EDTA- Menge zum Ablösen der Zellen	Kulturmedium- menge zur Zellvereinzellung
Flasche 25 cm ²	5 ml	3 ml	0,5 ml	2 ml
Flasche 75 cm ²	15 ml	5 ml	1,5 ml	6 ml
Flasche 175 cm ²	30 ml	7 ml	3 ml	12 ml
Petrischale 8 cm ²	1,5 ml	1 ml	0,5 ml	1 ml

3.2.1.4 Test auf Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen

Vor den Hauptexperimenten wurden die Zellen auf Mykoplasmenbefall getestet. Hiermit sollte sichergestellt werden, daß das Zellwachstum durch diese Mikroorganismen nicht beeinträchtigt wurde.

Zunächst wurden je $3 \cdot 10^5$ Zellen in ca. 3 ml Kulturmedium auf Kammerobjektträger gegeben und diese für 48 h im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Danach wurde das Kulturmedium abpipettiert und 4 ml Carnoy's Fixierlösung auf den Zellrasen gegeben. Nach 5 min wurde die Lösung abgesaugt und die Fixierung für abermals 10 min wiederholt. Anschließend wurden die Zellen luftgetrocknet. Ungefähr 4 ml der Färbelösung Bisbenzimidazol wurden auf den Zellrasen pipettiert und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Danach wurde die Färbelösung abpipettiert, die Kammern vom Objektträger gelöst und die Objektträger 3 mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach dem dritten Waschgang wurden die Objektträger auf saugfähiges Papier zur Entfernung des überschüssigen Wassers gelegt. Nun konnten die Präparate mit Eindecklösung (Citronensäure-Phosphatpuffer) eingedeckt und unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskopes mit einem Filter von 470-490 nm Wellenlänge betrachtet werden.

3.2.2 Wechselwirkung von Magnetitpartikeln mit der Zellmembran

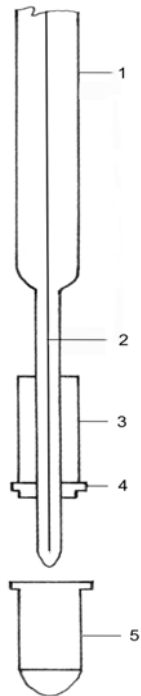
Diese Experimente dienten dazu herauszufinden, inwieweit die magnetischen Partikel an der Zellmembran von BT-20-Zellen immobilisiert werden und welchen zytotoxischen Effekt die Magnetitpartikel auf die Zellstrukturen haben. Zu dieser Fragestellung wurden die Magnetitproben 1 - 5 nach folgendem Schema untersucht:

In Kulturflaschen mit 25 cm² Wachstumsfläche wurden je 1*10⁶ Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium abpipettiert und einmal mit 3 ml PBS gespült. Mit diesem Schritt sollten störende Proteinreste des Kulturmediums entfernt werden. Nun wurde pro Kulturflasche eine der Magnetitproben zugegeben. Die verwendete Menge pro Versuchsansatz betrug durchschnittlich 37±16 mg. Alle Ferrofluide wurden direkt vor Verwendung für 3 min zur Partikelvereinzelung im Ultraschallbad behandelt. Zur besseren Verteilung der Magnetitpartikel wurden die Flaschen leicht geschwenkt und für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der ferrofluidhaltige Überstand abpipettiert und der Zellrasen 4 mal mit 3 ml PBS gespült. Zum Schluß wurden die Zellen mit je 1 ml 3%igem Glutaraldehyd fixiert. Die Zellen einer Kulturflasche wurden ohne Zugabe einer Magnetitprobe mit Glutaraldehyd fixiert und dienten als Nachweis der Vitalität der Zellen vor dem Experiment.

Im Institut für Anatomie I des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Leitung von Prof. Linß wurden die Zellen elektronenmikroskopisch aufgearbeitet. Nachfolgend ist die Prozedur kurz beschrieben. Die Zellen wurden von den Kulturflaschen abgeschabt, mit PBS gewaschen und 1%igem Osmiumtetroxid nachfixiert. Anschließend wurden die Versuchsproben in Durcupan ACM eingebettet, später in einer Stärke von 30 nm geschnitten und im Elektronenmikroskop betrachtet. Einige Schnitte wurden zur verbesserten Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat behandelt.

3.3 Evaluierung der minimalen kritischen Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen durch Erwärmung im Wasserbad

3.3.1 Vorbereitungen und Vorversuche



In Vorbereitung der Experimente zur Wärmeexposition mußten verschiedene Vorversuche durchgeführt werden. Eine Meßeinrichtung für Temperaturmessungen im sterilen Bereich sowie ein geeignetes Meßinstrument und dessen Kalibrierung wurden konzipiert. Des weiteren wurden die Einstelltemperaturen des Wasserbads (Thermostats) für die Wasserbadversuche evaluiert, um innerhalb von 4 min eine definierte Zieltemperatur zu erreichen.

3.3.1.1 Bau einer Vorrichtung zur Temperaturmessung einer Zellsuspension unter sterilen Bedingungen

Während der Exposition von Zellen im Wasserbad war es nötig, die Temperatur der Zellsuspension zu messen, ohne diese zu kontaminieren. Um diese Anforderung zu erfüllen, wurde eine Pasteurpipette modifiziert (Abbildung 2).

Die Spitze der Pasteurpipette wurde über eine Flamme gehalten und die Öffnung verschmolzen. Auf einem Eppendorfgefäßdeckel wurde ein runder, ca. 4-5 cm langer wärstabiler Plastikzylinder befestigt. Er diente zur Führung der Pipette. Anschließend wurde durch Gefäßdeckel und Plastikzylinder eine Öffnung gebohrt. Die Pasteurpipette wurde durch diese Öffnung geschoben und festgeklebt. Die Spitze trat soweit hervor, daß sie 2 mm vom Meniskus des Eppendorfgefäßes entfernt in die Testlösung eintauchte. Das Eppendorfgefäß konnte nun am Deckel mit der befestigten Pipette angebracht und die Versuchsprobe steril verschlossen werden.

Abb. 2: Aufbau einer modifizierten Pasteurpipette zur Temperaturmessung einer sterilen Zellsuspension
1 Pasteurpipette
2 Thermoelement
3 Plastikzylinder
4 Deckel des Eppendorfgefäßes
5 Eppendorfgefäß

3.3.1.2 Bau eines Thermoelementes

Zur Temperaturbestimmung wurde ein Thermoelement als Meßsonde verwendet (Abbildung 3). Das Meßprinzip beruht auf dem Messen von Spannungsunterschieden zwischen zwei Lötstellen, wovon sich eine Lötstelle in der Versuchsprobe (Meßlötstelle) und die andere Lötstelle im Eiswassergemisch (Referenzlötstelle) befindet.

Zum Aufbau des Meßfühlers dienten ein Konstantandraht von 0,16 mm Durchmesser und ein mit Isolierlack umhüllter Kupferdraht von 0,12 mm Durchmesser, beide etwa einen Meter lang. Die Drähte wurden miteinander verdreht, so daß keine Fläche entstand, durch die ein magnetisches Wechselfeld dringen und eine Wechselspannung induzieren konnte. An einem Ende wurden die beiden Drähte miteinander verlötet. Diese Stelle diente als Meßlötstelle. Am anderen Ende wurden sie an zwei ca. 15 cm lange und etwa 1 mm dicke Kupferstäbe zur besseren Handhabung verlötet. An den freien Enden dieser Kupferstäbe wurden nun wiederum ummantelte Kupferdrähte angelötet, welche miteinander verdreht die Verbindungsleitung zur Scardbuchse eines Multimeters darstellten. Mit Ausnahme der Meßlötstelle wurden alle Lötstellen mit Isolierschläuchen geschützt.

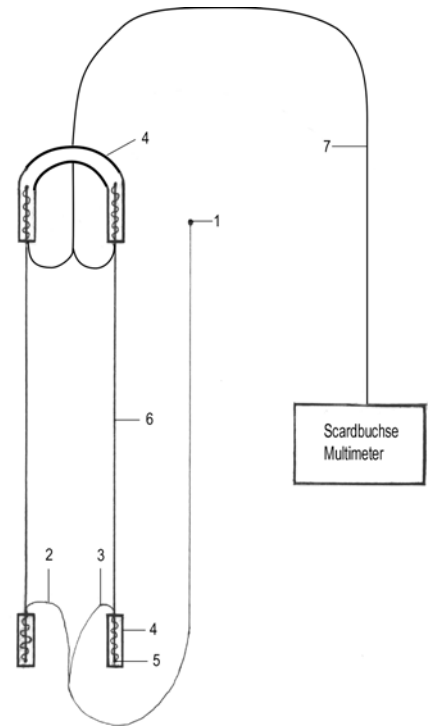


Abbildung 3:

Aufbau eines Thermoelements

1 Meßlötstelle

2 Konstantandraht

(\varnothing 0,16 mm)

3 Kupferdraht (\varnothing 0,12 mm)

4 Isolierschlauch

5 Referenzlötstelle

6 Kupferstab (\varnothing 1 mm)

7 ummantelter Kupferdraht

3.3.1.3 Kalibrierung eines Thermoelementes

Mit der Kalibrierung des Thermoelementes wurden den gemessenen Spannungen U bestimmte Temperaturen T zugewiesen (die Spannungsdifferenz ist der Temperaturdifferenz proportional) und in einer aus den Meßwerten erstellten Gleichung miteinander in Beziehung gesetzt. Somit war eine genaue Temperaturmessung möglich.

Ein Reagenzglas wurde etwa zu einem Drittel mit Wasser gefüllt und mit Hilfe eines Stativs befestigt. In das Reagenzglas wurden ein Thermometer und eine Pasteurpipette platziert und abermals mit einem Stativarm fixiert. Das zu kalibrierende Thermoelement wurde in die Pasteurpipette eingeführt. Es wurde darauf geachtet, daß die Meßlötstelle am unteren Ende der Pipette etwa 2 mm überstand und sich auf gleicher Höhe mit dem unteren Ende des Quecksilbervorratsvolumens des Thermometers befand. Die Referenzlötstelle befand sich in einem Eis-Wasser-Gemisch. Anschließend wurde das Reagenzglas in einem Wasserbad (Thermostat) platziert. Die Wasserspiegel von Thermostat und Reagenzglas befanden sich auf gleicher Höhe (Abbildung 4). Nachdem sich die Temperaturen von Reagenzglas und Thermostat angeglichen hatten, wurde die Temperatur am Thermometer und die Spannung am Multimeter

abgelesen. Auf der Grundlage der Temperatur-Spannungsbeziehung von Thermoelementen, die sich in der Gleichung

$$U=aT+bT^2 \text{ [Lieneweg 1976]}$$

ausdrückt (T =Temperatur in °C; U =Spannung in V), wurden die Temperatur- und Spannungswerte miteinander ins Verhältnis gesetzt, a und b stellen für jedes einzelne Thermoelement spezifische Konstanten dar.

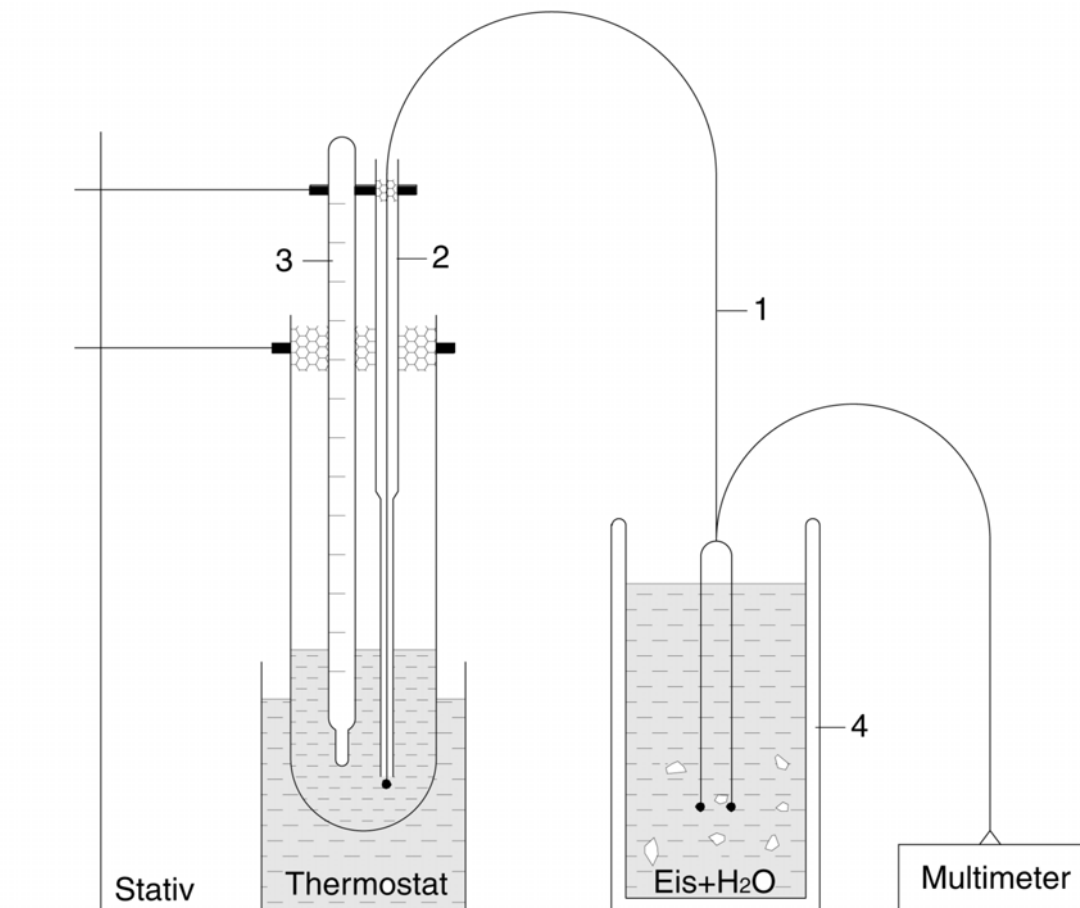


Abb.4: Versuchsaufbau zur Kalibrierung eines Thermoelementes

- | | |
|------------------|---------------|
| 1 Thermoelement | 3 Thermometer |
| 2 Pasteurpipette | 4 Dewargefäß |

3.3.1.4 Experimente zur Bestimmung der Parameter zur Erwärmung von Zellkulturmedium auf definierte Temperaturen

Ziel dieser Vorversuche war es, innerhalb von 4 Minuten beginnend bei 37°C die Temperaturen 47°C, 58°C, 65°C und 80°C in 1 ml Kulturmedium zu erreichen (Abbildung 5).

Zunächst wurde ein Dewargefäß mit Eis und Wasser etwa im Verhältnis 2:1 gefüllt. Darin wurden zwei Thermoelemente plaziert. Das Wasserbad wurde auf 37°C eingestellt und diente zur Erwärmung der Versuchsproben auf Körpertemperatur. Mittels des zweiten Wasserbads

(Thermostat) wurde das Kulturmedium auf definierte Temperaturen erwärmt. Hierzu wurde es auf die geschätzte Temperatur eingestellt. Die in Punkt 3.3.1.1 beschriebene modifizierte Pasteurpipette wurde mit Wasser gefüllt und in ein Stativ eingespannt. In das Eppendorfggefäß wurde 1 ml Kulturmedium gefüllt. In die Spitze der Pipette wurde die Meßlötstelle eines Thermoelements geführt. Mit Hilfe des zweiten Thermoelements wurde der Einfluß der Erwärmung des Materials der Pasteurpipette auf die Temperaturmessung überprüft. Die Lötstelle dieses zweiten Thermoelements wurde durch eine seitliche Öffnung im Deckel des Eppendorfggefäßes direkt in das Kulturmedium geführt und an der Spitze der Pasteurpipette mit dünnen Fäden befestigt. Beide Lötstellen befanden sich auf gleicher Höhe. Nun wurden die Daten mittels des Meßprogramms Testpoint akquiriert. Die Meßdauer betrug 600 s, alle 10 s wurde ein Spannungswert ermittelt. Die ersten 3 Meßwerte wurden außerhalb des Wasserbads, der 4. bis 33. Meßwert im Wasserbad, der 34. bis 57. Meßwert im zweiten Wasserbad (Thermostat) und der 58. bis 60. Meßwert außerhalb des Thermostats aufgenommen.

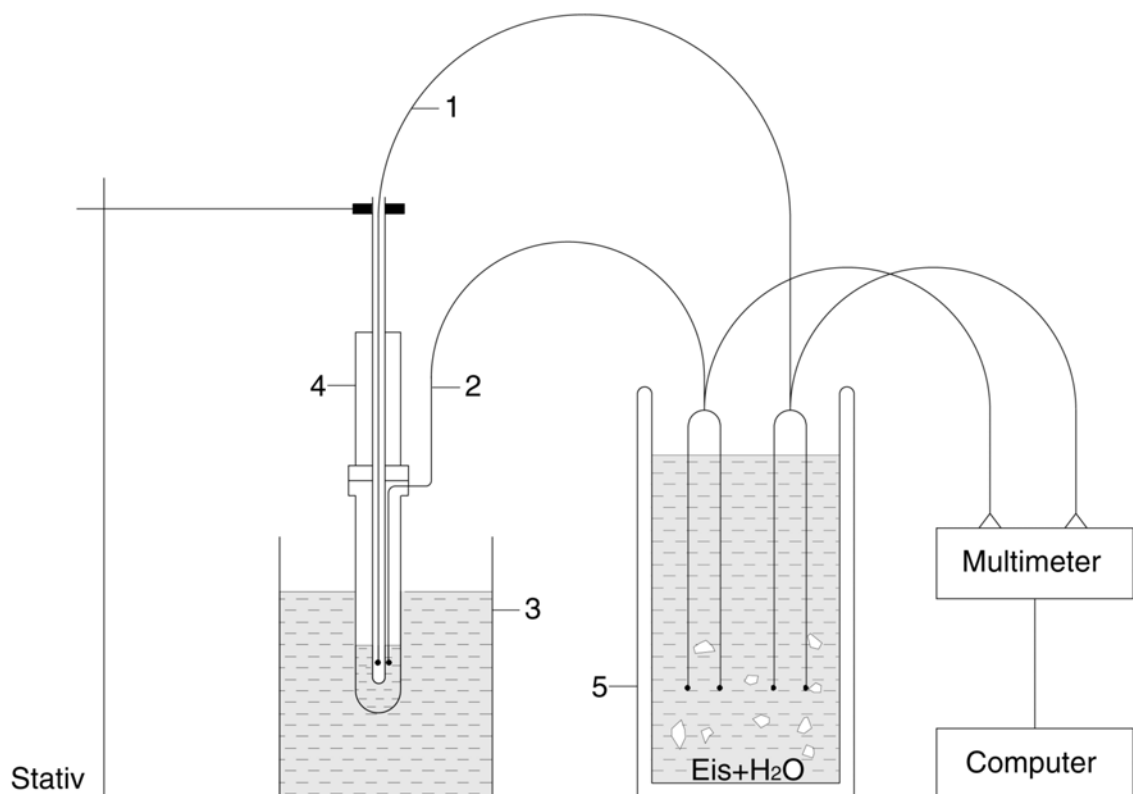


Abb. 5: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Einstelltemperatur des Wasserbads (Thermostat), um definierte Zieltemperaturen in 1 ml Kulturmedium nach 4 minütiger Wärmeexposition zu erreichen
 1 Thermoelement innerhalb der Pasteurpipette
 2 Thermoelement außerhalb der Pasteurpipette
 3 Austauschbares Temperaturbad bzw. Thermostat
 4 modifizierte Pasteurpipette
 5 Dewargefäß

Die Meßergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Sigmaplot 3.0 ausgewertet, d. h. wie unter 3.3.1.3 erwähnt die Spannungswerte in Temperaturwerte umgewandelt. Wurde die gewünschte Temperatur während 4 min im Thermostat erreicht, wurde die Messung mit der betreffenden Thermostatterperatur zwei mal wiederholt.

Auf gleiche Weise wurde die Zeit ermittelt, um 1 ml Kulturmedium nach Zwischenlagerung auf Eis auf 37°C zu erwärmen.

3.3.2 Evaluierung der minimalen kritischen Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen durch Erwärmung im Wasserbad

3.3.2.1 *Erwärmung von Zellen im Wasserbad*

Mit diesen Versuchen sollte herausgefunden werden, ab welcher Temperatur bei einer Expositionszeit von 4 min definitiv kein Zellwachstum mehr möglich ist. Gleichzeitig wurde die in diesem Experiment ermittelte Temperatur für Experimente zur Zellschädigung im Magnetfeld mittels Magnetitpartikel genutzt.

Die Zellen wurden wie unter Punkt 3.2.1.3 beschrieben geerntet, auf $1 \cdot 10^5$ Zellen pro ml Kulturmedium eingestellt und zu je 1 ml in Eppendorfgefäße gefüllt. Diese wurden bis zur Erwärmung auf Eis zwischengelagert. Versuchsaufbau und Versuchsablauf entsprechen exakt dem Vorversuch (3.3.1.4) zur Bestimmung der Parameter zur Erwärmung von Zellkulturmedium auf definierte Temperaturen. Allerdings wurde hier nur mit dem Thermoelement innerhalb der Pasteurpipette (Abb. 5) gearbeitet. Somit konnte die Sterilität der Zellsuspension gewährleistet werden. Pro Temperaturwert wurde ein Eppendorfgefäß mit Zellsuspension wärmebehandelt. Ein weiteres Eppendorfgefäß wurde während des gesamten Versuchs auf Eis gelagert und diente als Referenzansatz. Das Ergebnis dieses Referenzansatzes wurde in der Vitalitätsberechnung gleich 100% gesetzt (3.3.2.2).

3.3.2.2 *Vitalitätstest*

Als Maß für die Vitalität der Zellen diente die Bestimmung der Zellteilungsfähigkeit. Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an die Methode der Koloniebildungsfähigkeit [Freshney 1994]. Alle Versuche wurden 3 mal in jeweils Dreifachansätzen durchgeführt.

Die generelle Zellteilungsfähigkeit der Zelllinie betrug 13,3%. In Vorversuchen wurde eine günstige Aussaatdichte von 400 Zellen pro Petrischale (8 cm² Wachstumsfläche) und eine Wachstumszeit von einer Woche bestimmt. Daher wurden die Zellsuspensionen nach der Wärmebehandlung auf 400 Zellen pro 1,5 ml verdünnt und davon je 1,5 ml in 3 Petrischalen

ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von einer Woche im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen wurden die Zellen nach folgendem Protokoll fixiert, gefärbt und unter einer Stereolupe ausgewertet.

Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen 3 mal mit je 1 ml PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit 1 ml Methanol pro Petrischale für 15 min fixiert. Danach wurde das Methanol abpipettiert und die Petrischalen für 1 h luftgetrocknet. Nun wurden die Zellen mit 1,5 ml einer 5%igen Giemsa-Lösung 15 min lang angefärbt. Zum Schluß wurde mit jeweils 1 ml Aqua dest. gespült und die Petrischalen an der Luft getrocknet. Nun konnten die teilungsaktiven Zellen unter einer Stereolupe gezählt werden, wobei jede Zellverdopplung als aktive Zellteilungsfähigkeit definiert wurde. Zur Berechnung der relativen aktiven Zellteilungsfähigkeit kam folgende Gleichung zur Anwendung:

$$\text{relative Zellteilungsfähigkeit} = \frac{\text{Anzahl teilungsaktiver Zellen im Testansatz}}{\text{Anzahl teilungsaktiver Zellen im Referenzansatz}} * 100\%$$

Ergebnisse unter 100% sprechen für eine Beeinträchtigung der aktiven Zellteilungsfähigkeit, Werte über 100% für eine Stimulation.

3.3.3 Zytoskelettdarstellung von wärmeexponierten im Vergleich zu nicht wärmeexponierten Zellen

Zur beispielhaften Darstellung der schädigenden Wirkung von höheren Temperaturen bei kurzen Expositionszeiten wurde die Morphologie des Zytoskeletts, konkret der Zytoskelettkomponente β -Tubulin, von wärmebehandelten im Vergleich zu wärmeunbehandelten Zellen dargestellt. Zum Anfärben wurden als primärer Antikörper Anti- β -Tubulin und als sekundärer Antikörper Anti-Maus-IgG-FITC (Fluoreszein Isothiocyanat) ausgewählt. Hierzu wurden pro 36 mm² Wachstumsfläche (entspricht einer Kammer) zweier mehrkammerigen Chamberslides jeweils 1*10⁴ Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Danach wurde eines der Chamberslides für 4 min in einem 65°C warmen Wasserbad exponiert und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Die Anfärbung beider Chamberslides erfolgte dann nach dem in Tabelle 4 dargestellten Schema. Die Antikörperlösungen wurden kurz vor der Verwendung hergestellt.

Tab.4: Schematische Darstellung zur Durchführung der Anfärbung der β -Tubulins-Struktur des Cytoskeletts mit Anti- β -Tubulin (primärer Antikörper) und Anti-Maus-IgG-FITC (Sekundärer Antikörper)

Schritt	Lösung	Zeit	Lösungsmenge pro Kammer (36 mm ²)	Bedingungen
1	PBS	3×5 min	100 μ l	Raumtemperatur
2	Methanol	1×10 min	100 μ l	-20°C
3	Aceton	1×2 min	100 μ l	-20°C
4	PBS	3×5 min	100 μ l	Raumtemperatur
5	Blocklösung	1×20 min	100 μ l	feuchte Kammer, Raumtemperatur
6	Anti- β -Tubulin in Blocklösung 1:4	1×60 min	10 μ l	feuchte Kammer, Raumtemperatur
7	PBS	3×5 min	100 μ l	feuchte Kammer, Raumtemperatur
8	Anti-Maus-IgG- FITC in Blocklösung 1:200	1×60 min	60 μ l	feuchte Kammer, Raumtemperatur, dunkel
9	PBS	3×5 min	100 μ l	feuchte Kammer, Raumtemperatur, dunkel

Nach der Anfärbung wurden die Zellen mit Permafluor eingedeckt. Für die nächsten 24 h wurden die Präparate im Dunkeln bei 4°C bis zur Betrachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop (Filter 470-490 nm) gelagert.

3.4 Wärmebehandlung von Zellen durch magnetische Thermoablation

3.4.1 Vorbereitende Versuche

In Vorbereitung der Erwärmung von Zellen im Magnetwechselfeld wurde die Zytotoxizität der einzelnen Ferrofluide im Hinblick auf ihre spätere Anwendung im Magnetwechselfeld (3.4.2) untersucht. Desweiteren wurden die spezifische Absorptionsrate (SAR) eines ausgewählten Magnetits (Magnetitprobe 5) sowie die Magnetitmenge zum Erreichen der kritischen Temperatur für eine irreversible Schädigung von Zellen während einer Expositionszeit von 4 min im Magnetwechselfeld bestimmt.

3.4.1.1 Überprüfung der Zytotoxizität verschiedener Ferrofluidproben

Verschiedene Magnetitproben wurden im Hinblick auf ihren Einfluß auf das Zellwachstum untersucht. Die Zellen wurden wie unter Punkt 3.2.1.3 beschrieben von den Kulturflaschen abgelöst und auf $1 \cdot 10^5$ Zellen pro 1 ml Kulturmedium eingestellt. Von der entstandenen Verdünnung wurde jeweils 1 ml in ein Eppendorfgefäß gefüllt. Nun wurden pro Eppendorfgefäß $22,0 \pm 4,7$ mg einer der Magnetitproben 1-5 hinzugefügt und für 10-12 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eines der Eppendorfgefäße blieb ferrofluidfrei und diente als Referenzansatz. Anschließend wurden die Zellsuspensionen 37fach auf 400 Zellen pro 1,5 ml Kulturmedium verdünnt und in Petrischalen ausgesät. Die Ansätze wurden im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen für insgesamt 7 Tage bebrütet. Nach Anheftung der Zellen an die Plastikmatrix (ca. 12 h) erfolgte ein Kulturmedienwechsel, womit eventuell vorhandene Magnetitreste entfernt werden konnten. Auf einem anderen Weg wie beispielsweise durch Zentrifugation oder mittels Permanentmagneten, war dies nicht möglich. Zum Schluß wurden die Ansätze wie im Punkt 3.3.2.2 beschrieben, gefärbt und ausgewertet.

3.4.1.2 Bestimmung der spezifischen Absorptionsrate (SAR) einer ausgewählten Magnetitprobe

Mit der Bestimmung der SAR war es möglich, den Temperaturanstieg im Magnetwechselfeld pro Magnetitmasse abzuschätzen. Beispielhaft wurde die SAR der Magnetitprobe bestimmt, die nach den Untersuchungen zur Zytotoxizität die günstigsten Eigenschaften für das Experimentieren mit Zellen hat (4.4.1.1).

Zunächst wurde ein Reagenzglas mit 200 µl der Ferrofluidprobe 5 in ein Stativ eingespannt. Mit einer zweiten Halterung wurde in der Mitte des Reagenzglases eine Pasteurpipette befestigt. Sie diente als Führungsschacht für das Thermoelement. Das Thermoelement ragte

etwa 2 mm aus der Pipettenspitze heraus und tauchte in die Ferrofluidprobe ein. Die Öffnungen von Reagenzglas und Pipette wurden mit Watte verschlossen (Abbildung 6).

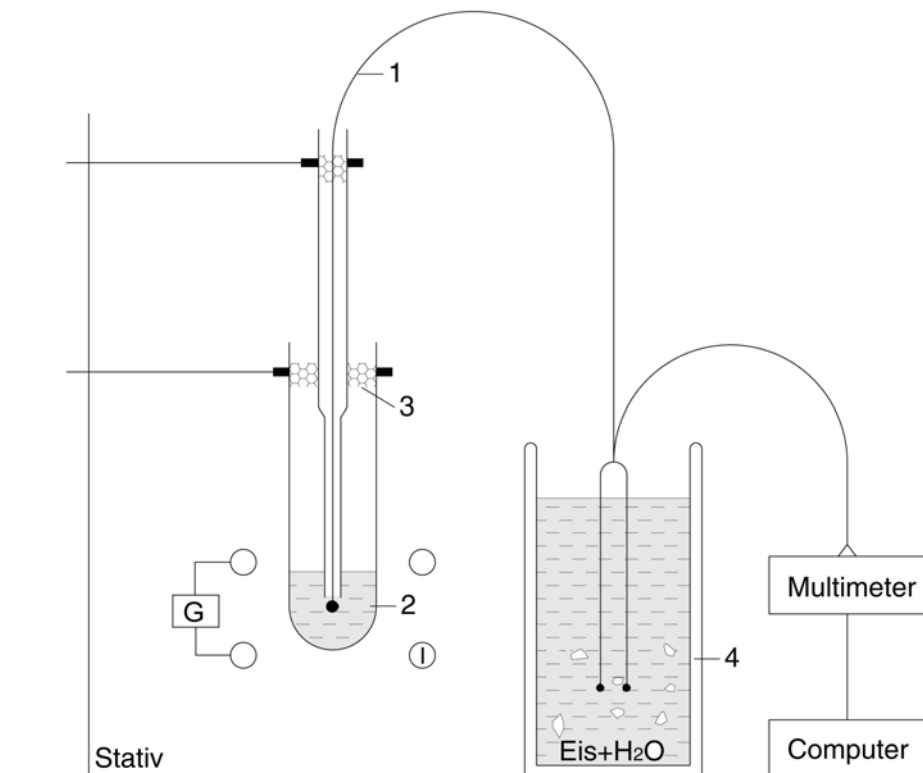


Abb.6: Versuchsaufbau zur Bestimmung der SAR einer ausgewählten Magnetitprobe (0,2 ml) für ein Magnetwechselfeld von 400 kHz; $6,5 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$

1 Thermoelement

3 Watte

G Generator

2 Magnetitprobe

4 Dewargefäß

I Induktorspule

Die Messung erfolgte über 90 Meßzyklen mit einem Zeitabstand von 2 s. Für den 1. bis 15. Meßwert blieb das Magnetfeld ausgeschaltet, die Magnetitprobe befand sich außerhalb der Induktorspule in mindestens einem halben Meter Abstand. Der 16. bis 30. Meßwert wurde bei eingeschaltetem Magnetfeldgenerator aufgenommen, die Magnetitprobe befand sich weiterhin außerhalb des Induktors. Während der Akquisition des 31. bis 60. Meßwertes befand sich die Magnetitprobe bei eingeschaltetem Magnetfeld im Zentrum der Induktorspule. Ab dem 61. Meßwert bis zum Ende der Messung wurde die Magnetitprobe außerhalb der Induktorspule positioniert. Der Magnetfeldgenerator wurde ab dem 76. Meßwert wieder ausgeschaltet.

Nach Beendigung der Messung wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Programms Sigmaplot[®] ausgewertet und der Temperaturverlauf in Abhängigkeit zur Zeit graphisch erstellt. Von diesem Graph wurde aus dem linearen Teil direkt nach Beginn der Magnetfeldexposition der Anstieg berechnet und die Regressionsgerade dargestellt. Hierzu wurden drei sich auf einer Geraden befindende Meßpunkte ausgewählt (Abb. 7). Der Temperaturverlauf vor dem Einschalten des

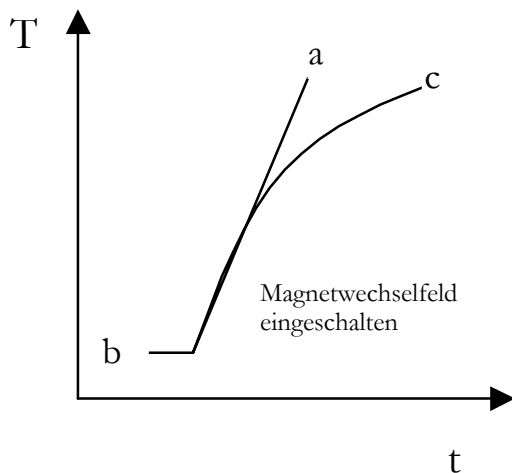


Abb.7: Zeitabhängige Temperaturkurve zur Bestimmung der SAR; schematische Darstellung

a Regressionsgerade

b Temperaturverlauf vor Einschalten des Magnetfeldgenerators

c Temperaturverlauf nach Einschalten des Magnetfeldgenerators

Magnetfeldgenerators wurde durch Differenzbildung berücksichtigt. Mit dem Ziel der Überprüfung von anderen erwärmenden Einflüssen (z.B. Luftströmungen) wurde vor der eigentlichen Messung eine Leermessung in Luft durchgeführt.

Nun wurde die Magnetitmasse der Ferrofluidprobe bestimmt. Hierzu wurden zehn mal 100 µl des Ferrofluids abgewogen und der Mittelwert gebildet. Mit diesem Wert und dem zuvor ermittelten Temperaturanstieg konnte die SAR nach folgender Berechnung (Gleichung 6) bestimmt werden. Unter der Annahme, daß der Anteil der Partikelhüllen im Ferrofluid vernachlässigt werden kann, gilt:

$$m_{FF} = m_W + m_E \quad (1)$$

$$m = \rho * V \quad (2)$$

$$V_{FF} = V_W + V_E \quad (3)$$

$$m_{FF} = V_W * \rho_W + V_E * \rho_E$$

(2) in (1) eingesetzt

$$m_{FF} = (V_{FF} - V_E) * \rho_W + V_E * \rho_E$$

(3) eingesetzt

$$m_{FF} = V_{FF} * \rho_W - V_E * \rho_W + V_E * \rho_E$$

ausmultipliziert

$$m_{FF} = 0,2 \text{ ml} * 0,997 \text{ g*ml}^{-1} - V_E * 0,997 \text{ g*ml}^{-1} + V_E * 5,2 \text{ g*ml}^{-1}$$

bekannte Werte eingesetzt

$$m_{FF} = 0,1994 \text{ g} + V_E(-0,997 \text{ g*ml}^{-1} + 5,2 \text{ g*ml}^{-1})$$

ausgeklammert und

ausgerechnet

$$V_E = (m_{FF} - 0,1994 \text{ g}) * (4,203 \text{ g*ml}^{-1})^{-1}$$

umgestellt und ausgerechnet

m_{FF} : Masse Ferrofluid [g] V_{FF} : Volumen Ferrofluid = 0,2 ml ρ_{FF} : Dichte Ferrofluid [g*ml^{-1}]

m_W : Masse Wasser [g] V_W : Volumen Wasser [ml] ρ_W : Dichte Wasser¹ = 0,997 g*ml^{-1}

m_E : Masse Eisenoxid [g] V_E : Volumen Eisenoxid [ml] ρ_E : Dichte Eisenoxid² = 5,2 g*ml^{-1}

¹ [Küster 1958]

² [Formeln und Tabellen 1993]

Mit dem errechneten V_E kann der Masseanteil an Magnetit des Ferrofluids über Gleichung 4 berechnet werden.

$$m_E = \rho_E * V_E \quad (4)$$

Über Gleichung 5 kann die Leistung und mit Gleichung 6 die spezifische Leistung errechnet werden. Die spezifische Leistung entspricht der SAR.

$$P = c_W * m_{FF} * a \quad (5)$$

$$SAR = P * m_E^{-1} \quad (6)$$

c_W : spezifische Wärmekapazität für Wasser = $4,19 \text{ kJ} * (\text{kg} * \text{K})^{-1}$ [Formeln und Tabellen 1993]

(Die Wärmekapazität des Eisenoxidanteils ist gegenüber der Wärmekapazität des Wassers vernachlässigbar.)

P =Leistung [$\text{W} * \text{g}^{-1}$] a : Steigung= $\Delta T * \Delta t^{-1}$

T =Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] t =Zeit [s]

Die SAR der Magnetitprobe wurde vor und nach der Sterilisation bestimmt und die gemittelten SAR-Werte der unsterilen und sterilen Magnetitproben anschließend mittels des t-Tests verglichen.

3.4.1.3 Bestimmung der Magnetitmenge zum Erreichen der kritischen Temperatur für die irreversible Schädigung von Zellen mittels magnetischer Thermoablation

Zur Erwärmung von Zellen im Magnetwechselfeld wurde die Ferrofluidprobe 5 ausgewählt. Zunächst wurde in einem Vorversuch die zum Erreichen einer Temperaturdifferenz von 21°C (37°C bis 58°C) benötigte Magnetitmenge bestimmt. Bei diesem Vorversuch wurde von Zimmertemperatur ausgegangen. Anschließend wurde die bestimmte Magnetitmenge zu 1 ml Kulturmedium gegeben, im Wasserbad auf 37°C äquilibriert und wärmeisoliert im Magnetwechselfeld die Erwärmung auf 58°C innerhalb 4 min mit einer erneuten Temperaturmessung überprüft (Abb. 8).

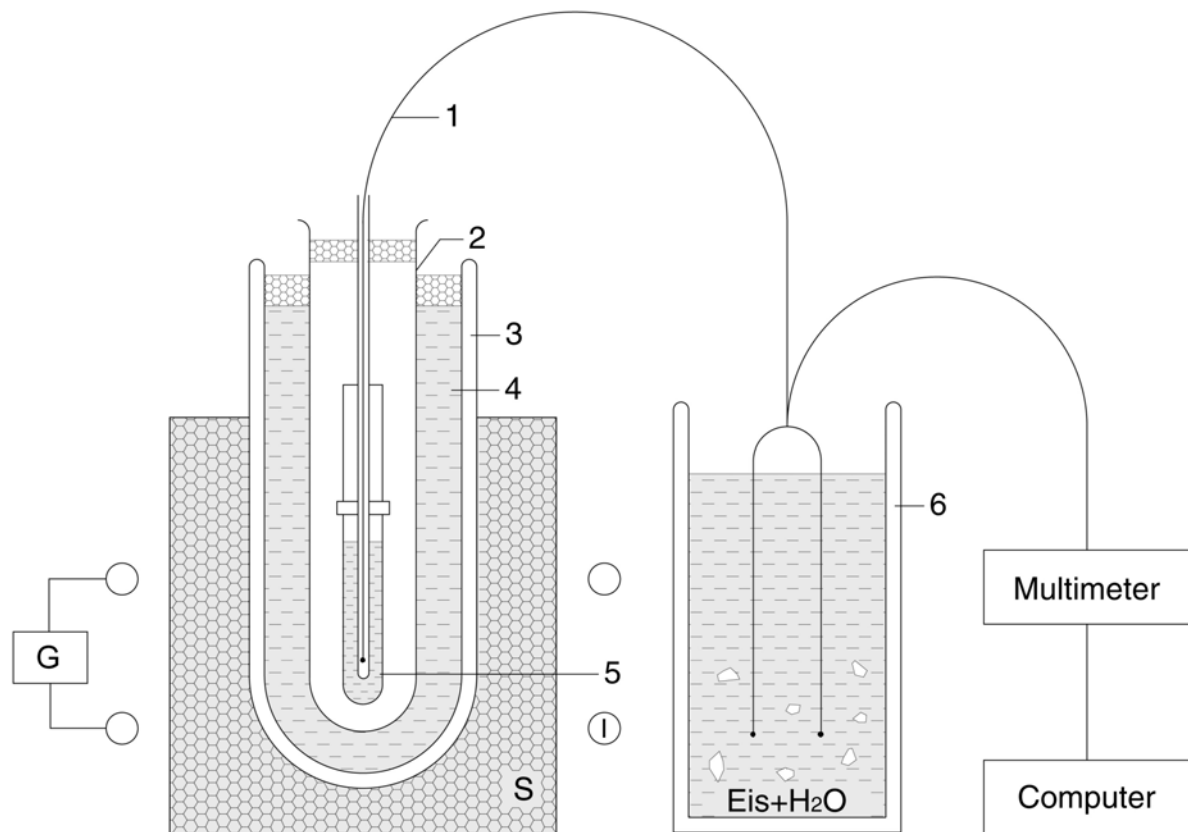


Abb.8: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Magnetitmenge, welche notwendig ist, um innerhalb von 4 min Expositionszeit im Magnetwechselfeld (400 kHz; $6,5 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$) eine Temperatur von 58°C (ausgehend von 37°C) zu erreichen (Wasserbad nicht dargestellt)

1 Thermoelement	3 Dewargefäß	5 Kulturmedium mit Magnetitzusatz
2 Reagenzglas	4 warmes Wasser (37°C)	6 Dewargefäß
G Generator	S Styropor	I Induktor

Hierzu wurde ein Eppendorfgefäß mit 1 ml Kulturmedium und der geschätzten Magnetitmenge (Magnetitprobe 5) gefüllt und am Deckel einer modifizierten Pasteurpipette befestigt. Diese wurde in ein Stativ eingespannt. Ein Thermoelement wurde, wie unter 3.3.1.2 beschrieben, eingeführt. Mit dem Ziel, die Versuchsprobe vor Auskühlung während der Magnetfeldexposition zu schützen, wurde die Versuchsprobe wie folgt wärmeisoliert: Ein von Styropor (S) umgebenes Dewargefäß wurde mit 37°C warmen Wasser gefüllt und in der Induktorspule (9 cm Durchmesser) aufgestellt. Im Dewargefäß wurde ein luftgefülltes Reagenzglas positioniert, in welches die modifizierte Pasteurpipette mit der Versuchsprobe eingeführt werden konnte. Beides, das Dewargefäß wie auch das Reagenzglas, wurden zur Öffnung hin mit Styropor bzw. Watte verschlossen. Die Akquisition der Daten erfolgte wie unter 3.3.1.4 beschrieben. Allerdings wurde die Versuchsprobe vom 34. bis 60. Meßzyklus in der Spule positioniert. Das Magnetfeld war vom 32. bis zum 57. Meßwert eingeschaltet. Während des Umsetzens der Versuchsprobe vom Wasserbad in die Induktorspule wurde diese geschüttelt. Dadurch wurden die sich während der

Erwärmung im Wasserbad abgesetzten Magnetitpartikel erneut suspendiert. Die Ergebnisse wurden wie unter 3.3.1.4 beschrieben ausgewertet.

3.4.2 Wärmebehandlung von Zellen durch magnetische Thermoablation mittels einer ausgewählten Magnetitprobe

Mit diesem Versuch sollte herausgefunden werden, inwieweit eine Zellproliferation nach 4 min Exposition im Magnetwechselfeld mit Magnetitzusatz und einer Erwärmung von 37°C auf 58°C noch möglich ist.

Die Vorbereitung der Zellen auf $1 \cdot 10^5$ pro 1 ml Kulturmedium und Lagerung bis zum Versuchsbeginn erfolgte wie unter Punkt 3.3.2 beschrieben. Abermals verblieb ein Eppendorfgefäß während des gesamten Versuchs auf Eis gelagert und diente als Referenzansatz.

Die Zellen wurden unter der Werkbank mit 400 µl der Magnetitprobe 5 versetzt, in eine modifizierte Pasteurpipette abgefüllt und steril verschlossen. Der weitere Versuchsaufbau wie auch Versuchsablauf glich dem in Punkt 3.4.1.3 dargestellten.

Zusätzlich wurde die Wirkung des Magnetfeldes auf die Zellen überprüft. Hierfür wurde ein Eppendorfgefäß mit Zellen ohne Ferrofluidzusatz ebenfalls im Wasserbad erwärmt und im Magnetwechselfeld exponiert. Wie unter 3.3.2 beschrieben, wurden die Zellsuspensionen anschließend aufgearbeitet und die Zellvitalität bestimmt. Die Ergebnisse aus diesem Versuch wurden mit den Ergebnisse der Exposition von Zellen im Wasserbad interpoliert.

3.4.3 Berechnung der applizierten Hitzedosen während der Wärmebehandlung von Zellen im Wasserbad und mittels magnetischer Thermoablation

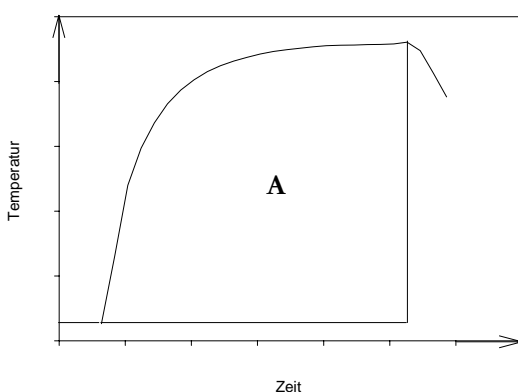


Abb. 9: Schematische Temperatur-Zeit-Kurve zur Berechnung der applizierten Hitzedosis
A stellt die Fläche unter der Kurve dar und entspricht der applizierten Hitzedosis

Um eine vergleichende Aussage über die Effektivität beider Methoden, der Erwärmung von Zellen im Wasserbad und mittels magnetischer Thermoablation treffen zu können, wurden die applizierten Hitzedosen beider Versuche berechnet. Die applizierte Hitzedosis entspricht der zugeführten Wärmemenge in einer definierten Zeiteinheit. Sie wird mit der Maßeinheit °C*min angegeben. Berechnungsgrundlage sind die während der Experimente aufgenommenen Temperatur-Zeit-

Kurven. Abbildung 9 zeigt solch eine Temperatur-Zeit-Kurve schematisch. Die applizierte Hitzedosis stellt die Fläche unter der Kurve dar und ergibt sich aus Temperatur mal Zeit.

4. Ergebnisse

4.1 Sterilisation der Ferrofluide

Die Untersuchungen ergaben eine vollständige Sterilität der Ferrofluide nach der Autoklavierung bei 121°C (200 kPa) über 0 min und 5 min, d. h. auf keinem der Agarböden (Blutagar, Winkleagar, Sabaroundagar) war ein Keimwachstum nachweisbar und somit die Ergebnisse negativ. Makroskopisch blieben die Magnetitproben 1-4 nach der Sterilisation unverändert. Bei Magnetitprobe 5 hingegen fiel eine Zunahme der Verklumpung und Zähigkeit durch die Sterilisation auf (Tabelle 5).

Tab. 5: Sterilisationsbedingte (121°C; 200 kPa; 0 min. bzw. 5 min), makroskopisch sichtbare Veränderungen der Ferrofluide 1-5 in Bezug auf ihre Beschaffenheit und Zähigkeit

Magnetit-probe	Beschaffenheit der Ferrofluide nach der Sterilisation
1	unverändert
2	unverändert
3	unverändert
4	unverändert
5	Zunahme der Verklumpung und Zähigkeit

4.2 Ergebnisse der Wechselwirkung von Magnetitpartikeln mit der Zellmembran humaner Adenokarzinomzellen

4.2.1 Ergebnis zur Kontrolle der Zellkulturen auf Befall mit Mykoplasmen

Das Ergebnis des Mycoplasmentests der verwendeten Zellkulturen fiel negativ aus, d. h. die Zellen waren nicht befallen. Die Zellkerne erschienen unter dem Mikroskop glatt begrenzt und rund. Es waren keine Schleier oder vernebelte Säume bzw. keine Kernreste erkennbar wie es für einen Mycoplasmenbefall typisch ist. Dies verdeutlicht Abbildung 10a.

Beispielhaft zeigt Abbildung 10b eine Positivkontrolle des Mycoplasmentests an Fibroblasten. Auffällig sind vermehrte Zellkernreste mit gekörntem Aussehen und unregelmäßige Kernränder, die teils von einem vernebelten, unscharf abgegrenzten Saum umgeben sind.

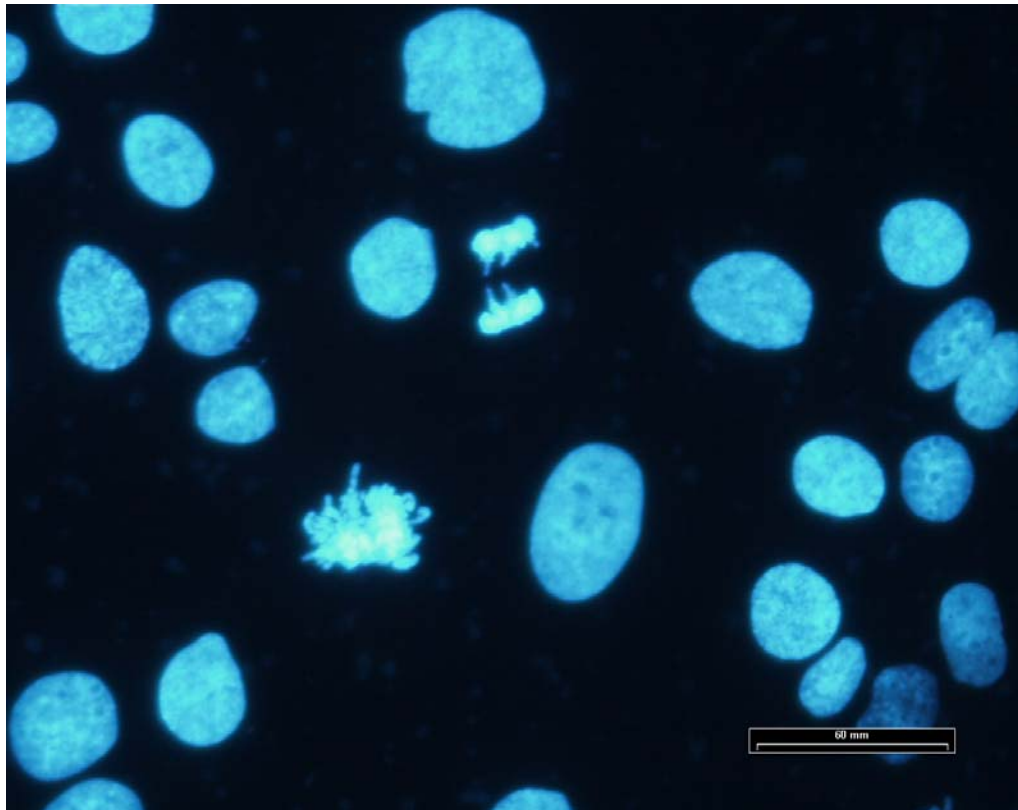


Abb. 10a: Gesunde BT-20-Zellen ohne Mycoplasmenbefall, Darstellung der glatt begrenzten Zellkerne durch Anfärbung mit Bisbenzimidazol, in der Bildmitte sind zwei Mitosen erkennbar; Meßbalken: 60 μ m

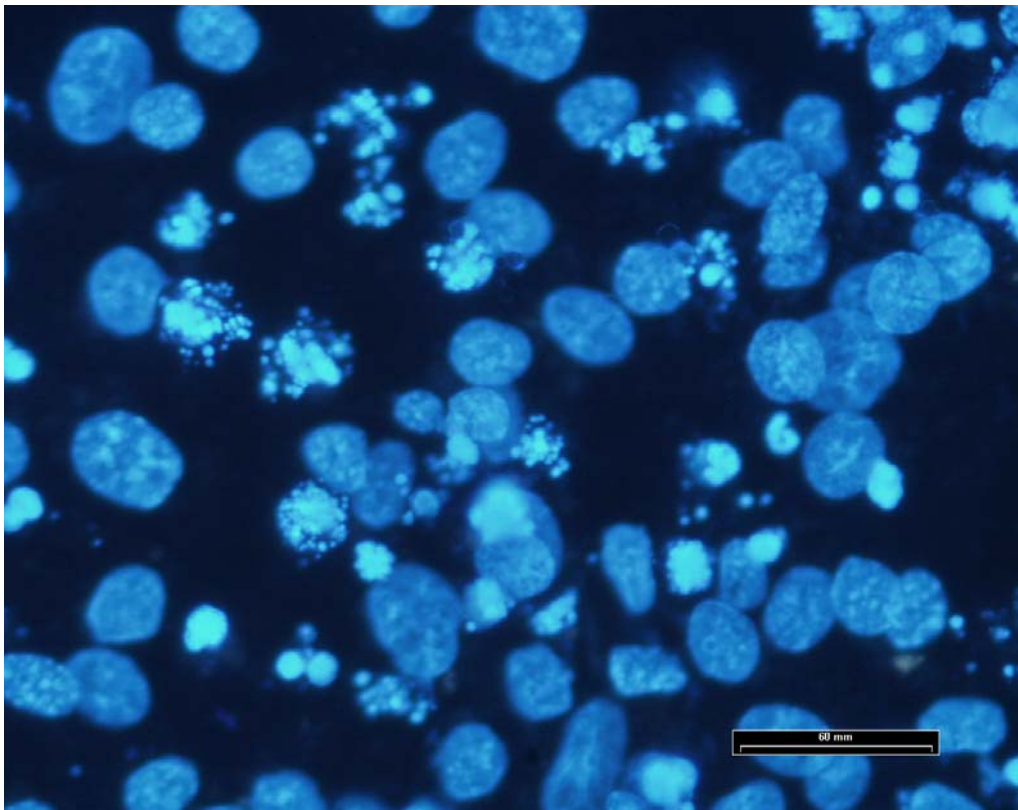


Abb. 10b: Firmeneigene (Biochrom) Positivkontrolle des Mycoplasmentests an Fibroblasten mit *M. hyorhinitis*- oder *M. argininitis*-zellen; die mit Bisbenzimidazol angefarbten Zellkerne und Zellkernreste zeigen unregelmäßige Kernränder teils mit vernebelten Säumen; Meßbalken: 60 μ m

4.2.2 Morphologische Beobachtungen der Wechselwirkungen von Magnetitpartikeln mit der Zellmembran humaner Adenokarzinomzellen

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß prinzipiell eine Anlagerung von Magnetitpartikeln an die Zellmembran möglich ist. Gleichzeitig gaben die elektronenmikroskopischen Aufnahmen Anhaltspunkte über die zytotoxischen Eigenschaften der einzelnen Magnetitproben.

Die Magnetitteilchen der Magnetitprobe 1 lagerten sich nur vereinzelt an die Tumorzellmembran an. Die Magnetitpartikel erschienen stark agglomeriert, die Zellen stellten sich mit verklumptem Chromatin und geschwollenen Mitochondrien geschädigt dar. Abbildung 11 verdeutlicht die Beobachtungen. Am oberen Zellpol ist eine Agglomeration von Magnetitpartikeln erkennbar.

Eine stärkere Wechselwirkung zwischen Magnetitpartikeln und Zellmembran war in bezug auf Magnetitprobe 2 erkennbar. Hier zog sich ein ungleichmäßig dichter Saum aus Magnetitpartikeln mit sichtbaren kleinen Verklumpungen an der Zelle entlang. Auffällig war die starke Zerstörung sowohl des Zytoplasmas als auch der Zellkerne. Beides, Zytoplasma und Zellkerne, erschienen inhomogen und aufgelockert. Diese Beobachtungen spiegeln sich in Abbildung 12 wider.

Die Wechselwirkungen der Magnetitproben 3 und 4 mit der Zellmembran ließen eine regelmäßige, sich in einem feinen Saum darstellende Anlagerung der Magnetitpartikel an die Zellwandstrukturen erkennen. Auch hier zeigten die Zellen keine gesunde Morphologie. Die Mitochondrien waren geschwollen und das Chromatin verklumpt. Abbildung 13 stellt die Anlagerung von Magnetitprobe 3 und Abbildung 14 die Anlagerung von Magnetitprobe 4 an eine Tumorzelle dar.

Magnetitprobe 5 ließ eine sehr sporadische Anlagerung an gesunde BT-20-Zellen mit intakten Zellorganellen erkennen. Vereinzelt kam es zu Agglomerationen von Magnetitpartikeln und Anlagerungen dieser an die Zellfortsätze (Mikrovilli). Die Beobachtungen werden in Abbildung 15 veranschaulicht.

Die Zellen ohne Magnetitzusatz und sofortiger Fixierung mit Glutaraldehyd zeigten eine vitale Morphologie, die Zellorganellen waren gut sichtbar. Abbildung 16 zeigt solch eine BT-20-Zelle, die auf der Plastematrix einer Kulturflasche anliegt.

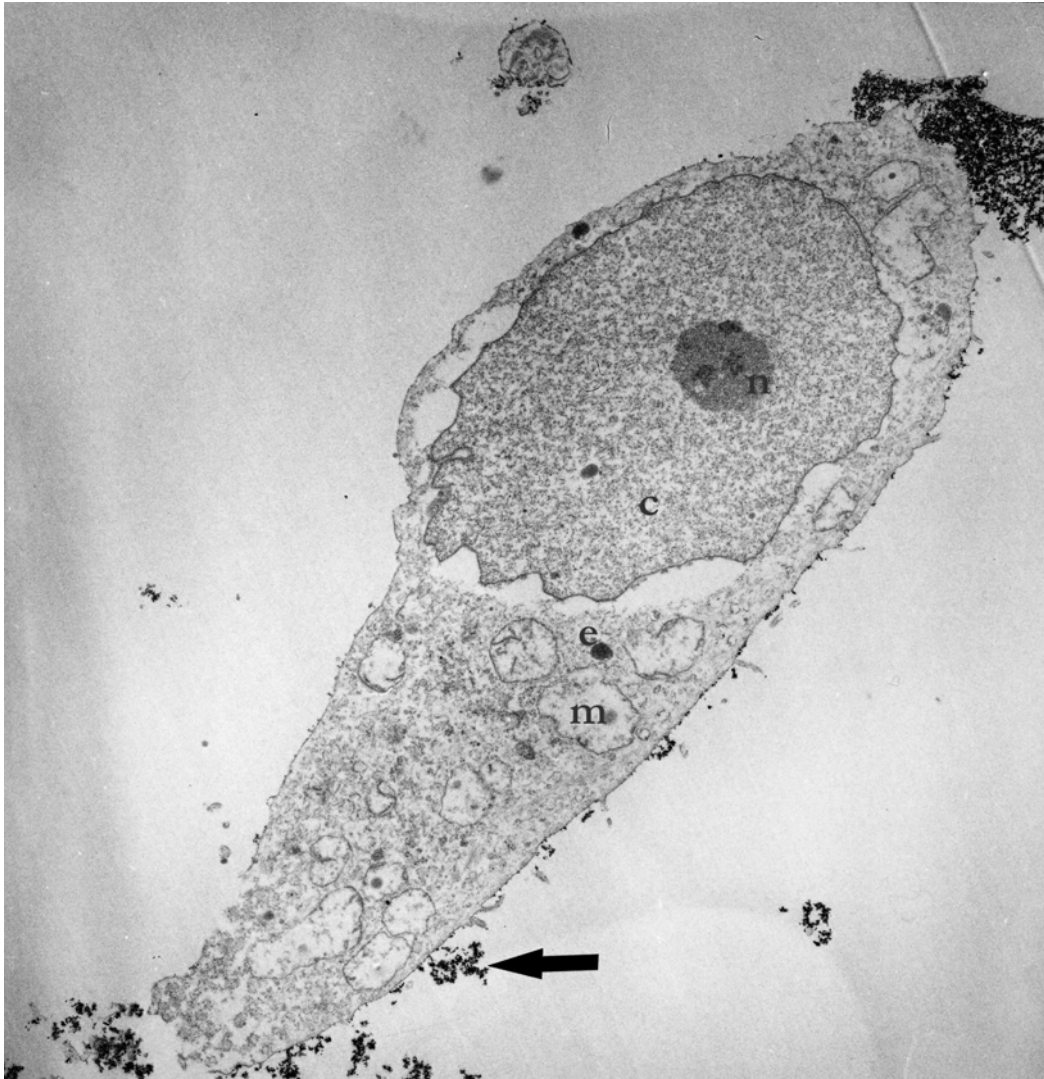


Abb. 11: Wechselwirkung der Magnetitprobe 1 (37 ± 16 mg) mit der Zellmembran einer BT-20-Zelle nach 4-minütiger Inkubationszeit und anschließender Spülung mit PBS; c-verklumptes Chromatin; e - elektronendichter Einschuß; m - geschwollenes Mitochondrium; n - Nukleolus; ⌘ - agglomerierte Magnetitpartikel
Vergrößerung: 7900 fach

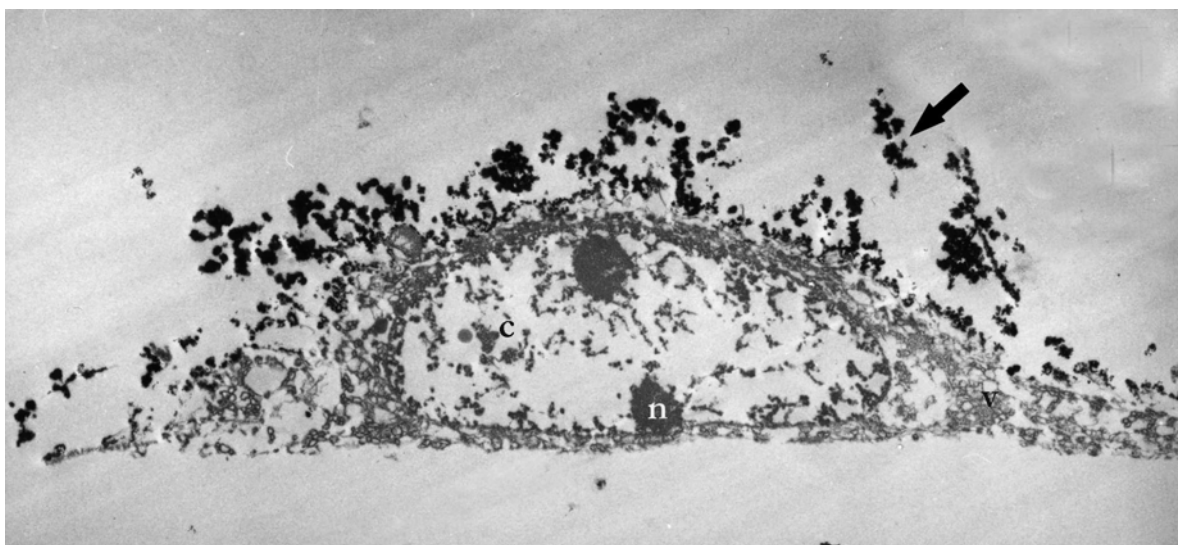


Abb. 12: Anlagerung der Magnetitprobe 2 (37 ± 16 mg) an eine BT-20-Zelle nach 4-minütiger Inkubationszeit und anschließender Spülung mit PBS; c - verklumpte Chromatinreste; n - Nukleolus; v - multiple Vakuolen; ⌘ - agglomerierte Magnetitpartikel
Vergrößerung: 10700 fach

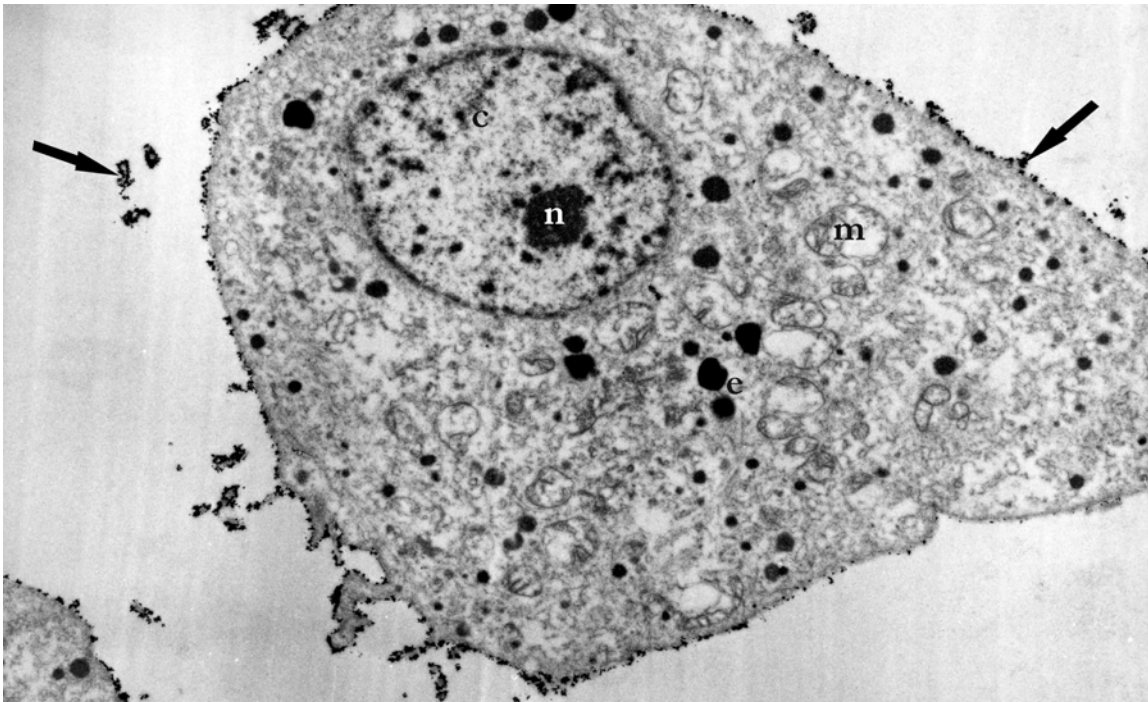


Abb. 13: Anlagerung der Magnetitprobe 3 (37 ± 16 mg) an eine BT-20-Zelle nach 4-minütiger Inkubationszeit und anschließender Spülung mit PBS; c-verklumptes Chromatin; e - elektronendichter Einschuß; m - geschwollenes Mitochondrium; n - Nukleolus; \ agglomerierte Magnetitpartikel
Vergrößerung: 7500 fach

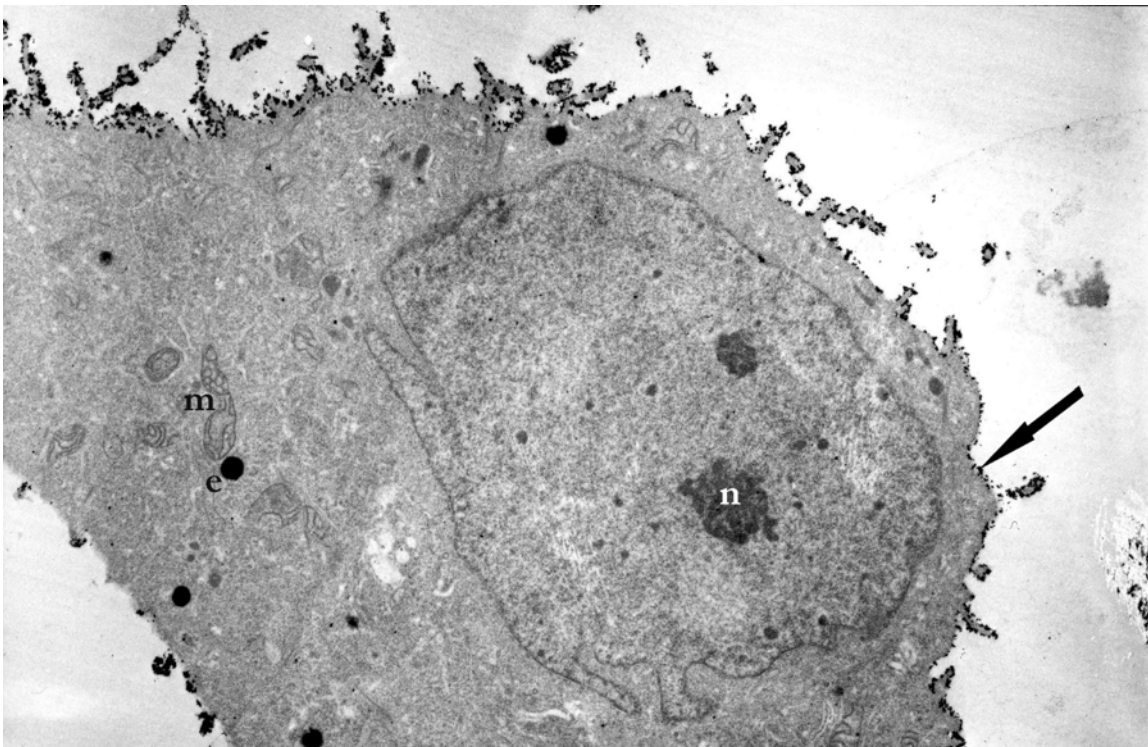


Abb. 14: Anlagerung von Magnetitprobe 4 (37 ± 16 mg) an eine BT-20-Zelle nach 4-minütiger Inkubationszeit und anschließender Spülung mit PBS; e - elektronendichter Einschuß; m - geschwollenes Mitochondrium; n - Nukleolus; \ Saum agglomerierter Magnetitpartikel an der Zellmembran
Vergrößerung: 7100 fach

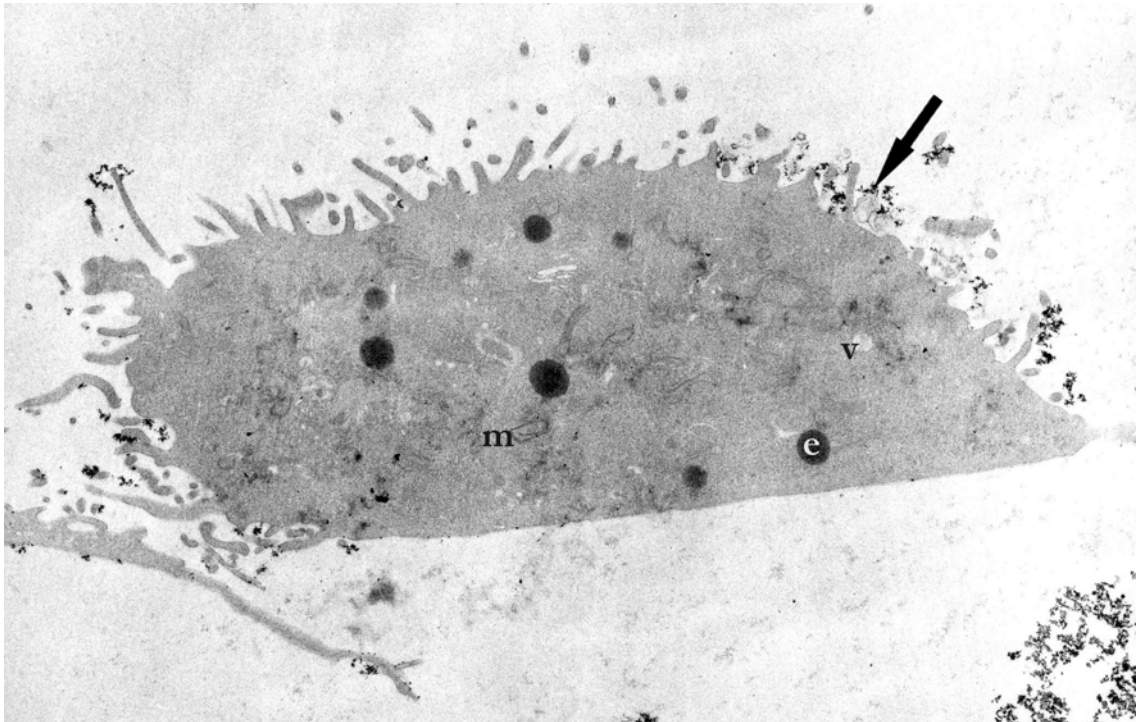


Abb. 15: Wechselwirkung der Magnetitprobe 5 (37 ± 16 mg) mit der Zellmembran einer BT-20-Zelle nach 4-minütiger Inkubationszeit und anschließender Spülung mit PBS; e - elektronendichter Einschuß; m - Mitochondrium; v - Vakuole; \ agglomerierte Magnetitpartikel
Vergrößerung: 7000 fach

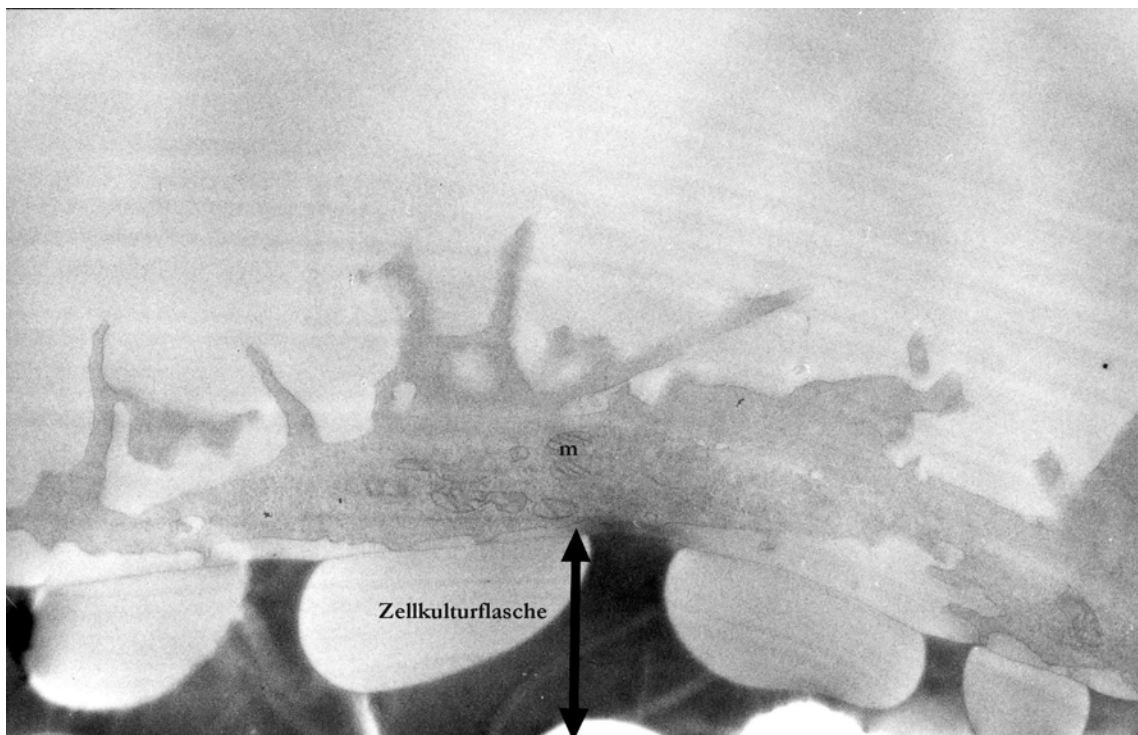


Abb. 16: Mit Glutaraldehyd fixierte gesunde BT-20-Zelle, an einer Kulturflasche geschnitten; m - Mitochondrium
Vergrößerung: 14000 fach

4.3 Die kritische Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen durch Erwärmung im Wasserbad

4.3.1 Parameter zur Erwärmung von Zellkulturmedium auf definierte Temperaturen

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Einstelltemperatur des Wasserbads b (Thermostat) zeigen, daß die Einstelltemperatur des Thermostaten 2-4°C über der in 4 min zu erreichenden Zieltemperatur lag. Die Temperaturdifferenz zwischen den Thermoelementen innerhalb und außerhalb der modifizierten Pasteurpipette (Abb. 5) lag zwischen 0,1-0,7°C (Tabelle 7).

Tab.7: Die Einstelltemperaturen für das Wasserbad b, um definierte Zieltemperaturen in 1 ml Kulturmedium nach 4-minütiger Wärmeexposition zu erreichen sowie die Temperaturdifferenz zwischen den Thermoelementen innerhalb und außerhalb der modifizierten Pasteurpipette (siehe Versuchsaufbau Abb. 5)

Zieltemperatur nach 4-minütiger Wärmeexposition	Einstelltemperatur des Wasserbads	Temperaturdifferenz zwischen den Thermoelementen innerhalb und außerhalb der modifizierten Pasteurpipette
47°C	49°C	0,1°C
58°C	60°C	0,1°C
65°C	68°C	0,2°C
80°C	84°C	0,7°C

4.3.2 Die kritische Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen durch Erwärmung im Wasserbad

Zunächst erfolgte eine Angleichung der Temperatur der Zellsuspension von der Zwischenlagerung auf Eis auf 37°C (Wasserbad a). Während der direkt anschließenden Exposition in einem auf genaue Zieltemperaturen eingestellten Wasserbad (Wasserbad b, (Thermostat)), erfolgte ein steiler Anstieg der Temperatur. Nach etwa einer Minute Expositionszeit hatte sich die Temperatur weitgehend angeglichen und die Kurve näherte sich asymptotisch der Zieltemperatur. Außerhalb des Thermostats fiel die Temperatur wieder stark ab. Die entsprechenden gemittelten Temperaturverläufe der Erwärmung von Zellsuspensionen im Wasserbad sind mit Standardabweichung in Abbildung 17 dargestellt.

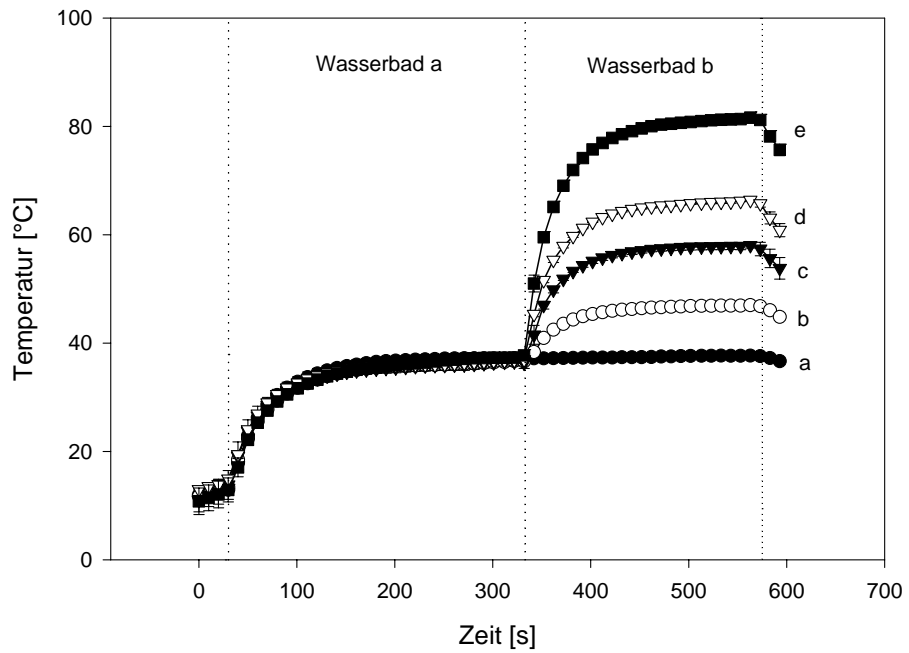


Abb. 17: Erwärmung von BT-20 Zellen ($1 \cdot 10^5$ in 1 ml Kulturmedium) auf 37°C (Wasserbad a) und anschließende Erwärmung auf verschiedene Zieltemperaturen (Wasserbad b); Expositionszeit: 4 min; Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen; Die Balken der Standardabweichung sind teilweise kleiner als die Symbole
a: 37°C b: 47°C c: 58°C d: 65°C e: 80°C

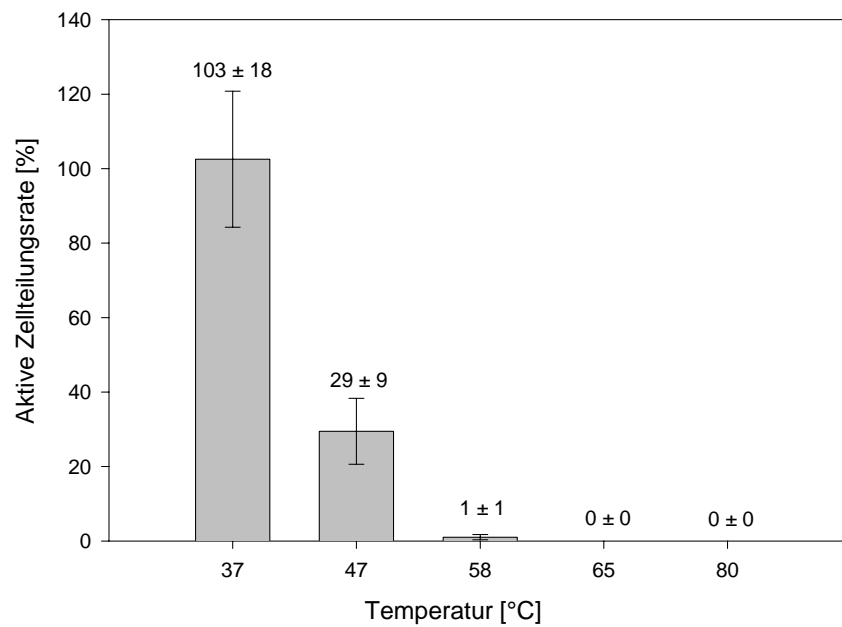


Abb. 18: Aktive Zellteilungsrate von BT-20 Zellen (bestimmt nach 3.3.2.2) nach Erwärmung im Wasserbad auf verschiedene Zieltemperaturen; Expositionszeit: 4 min; anschließende Aussaat der Zellen für eine Woche unter Standardkulturbedingungen; Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen in bezug auf einen unbehandelten Referenzansatz

Die Exposition der Zellen im 37°C warmen Wasserbad brachte eine leichte Stimulation der aktiven Zellteilungsfähigkeit von etwa 3% im Vergleich zu den in diesem Zeitraum auf Eis gelagerten Kontrollzellen. Die Exposition der Zellen bei 47°C ließ einen signifikanten Abfall der aktiven Zellteilungsfähigkeit erkennen. Bei 58°C lag sie nur noch bei 1% der unbehandelten Kontrollzellen. Diese Zellen zeigten eine abnorme und verkümmerte Morphologie (Daten nicht gezeigt). Bei 65°C und 80°C war gar keine Zellteilung zu beobachten. Die Ergebnisse der Erwärmung von Zellen im Wasserbad sind in Abbildung 18 einzusehen.

4.3.3 Ergebnisse der Zytoskelettdarstellung von wärme-exponierten Zellen im Vergleich zu nicht-wärme-exponierten Zellen

Bei BT-20-Zellen ohne Wärmeexposition war eine feine fädige und filigrane Struktur des Cytoskeletts deutlich erkennbar. Diese Befunde verdeutlicht Abbildung 19.

Im Gegensatz dazu war das Cytoskelett der Zellen nach Wärmeexposition stark verändert. Auffällig waren die mottenfraßartigen Aussparungen des Zellkerns sowie strukturlose Flächen im Cytoskelettnetz. Das Cytoskelett wirkte geschrumpft und hatte seine feine fädige Struktur eingebüßt. Außerdem erschien es inhomogen und milchig. Abbildung 20 veranschaulicht eine solche durch Wärmeexposition geschädigte Zelle.

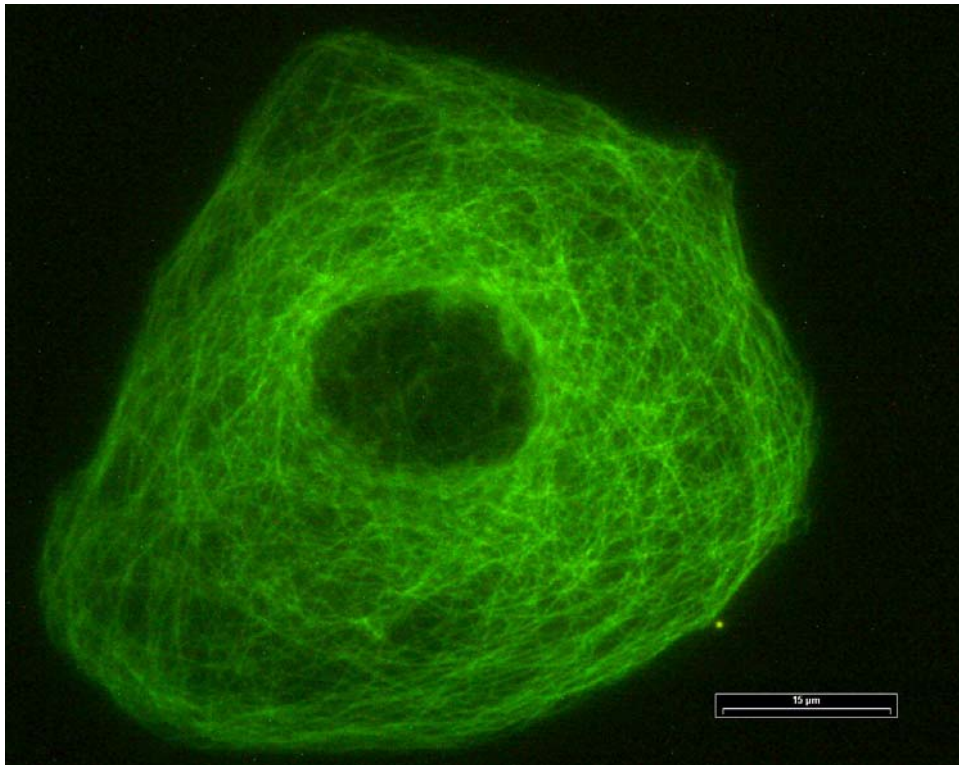


Abb. 19: Immunhistochemische FITC-Darstellung der β -Tubulinkomponente des Cytoskeletts einer nicht wärmebehandelten BT-20-Zelle; Meßbalken: 15 μm

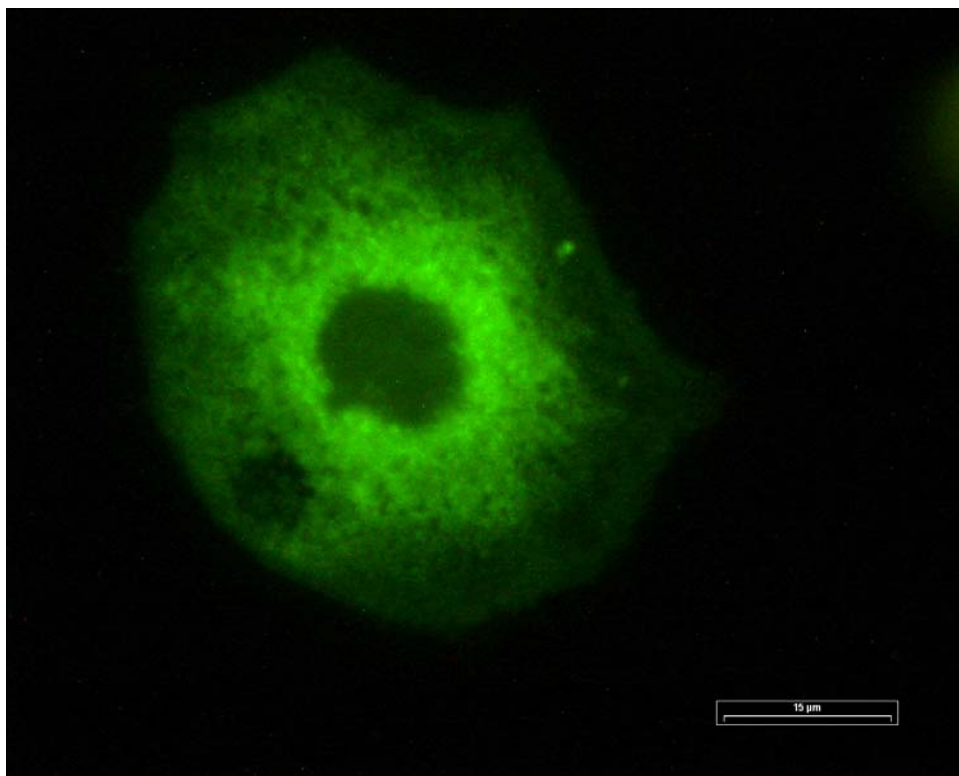


Abb. 20: Immunhistochemische FITC-Darstellung der β -Tubulinkomponente des Cytoskeletts nach Behandlung von BT-20-Zellen im Wasserbad für 4 Minuten bei 65°C. Die Färbung erfolgte 1 h nach der Wärmebehandlung; Meßbalken: 15 μm

4.4 Ergebnisse der Wärmebehandlung von Zellen durch magnetische Thermoablation

4.4.1 Ergebnisse der vorbereitenden Versuche

4.4.1.1 Ergebnisse der Zytotoxizitätsprüfung von Ferrofluiden

Die Magnetitproben 1, 3 und 4 beeinflussten die Vitalität der Zellen signifikant. Die aktive Zellteilungsrate betrug $14 \pm 5\%$, $23 \pm 5\%$ bzw. $37 \pm 7\%$. Magnetitprobe 2 hatte eine so starke zytotoxische Wirkung, daß gar keine Vitalität der Zellen mehr nachweisbar war. Einzige Magnetitprobe mit einer sehr geringen Beeinflussung der aktiven Zellteilungsfähigkeit war Magnetitprobe 5 mit $92 \pm 4\%$ (Tabelle 8).

Tabelle 8: Aktive Zellteilungsrate von BT-20-Zellpopulationen (bestimmt nach 3.3.2.2) nach Zugabe von $22 \pm 4,7$ mg Magnetit der Magnetitproben 1-5 für 10-12 min und anschließender Kultivierung der Zellen für eine Woche unter Standardkulturbedingungen; Prozentangaben in bezug auf einen unbehandelten Referenzansatz. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen

Magnetitprobe	1	2	3	4	5
Aktive Zellteilungsrate mit Standardabweichung in %	14 ± 5	0 ± 0	23 ± 5	37 ± 7	92 ± 4

4.4.1.2 Die SAR eines ausgewählten Ferrofluids

Die SAR von Magnetitprobe 5 wurde im unsterilen und sterilen Zustand bestimmt. Die Temperatur-Zeit-Kurve ergab während der Magnetexposition des Ferrofluids einen stetigen Anstieg. Befand sich die Magnetitprobe wieder außerhalb des Magnetfeldes, fiel die Temperatur rasch ab. Abbildung 21 zeigt die Temperaturentwicklung im Magnetfeld. Die weiß unterlegten Punkte geben die Meßwerte wieder, aus denen die Parameter der Regressionsgeraden a berechnet wurden.

Nach Berechnung ergab sich für die unsterile Magnetitprobe ein SAR-Wert von $26,5 \pm 1,2 \text{ W} \cdot \text{g}^{-1}$, für die sterile Magnetitprobe ein SAR-Wert von $25,1 \pm 0,7 \text{ W} \cdot \text{g}^{-1}$. Der Vergleich der Mittelwerte der SAR zwischen der sterilen und der unsterilen Magnetitprobe (t-Test, Signifikanzniveau $\alpha=0,01$) ergab keinen signifikanten Unterschied (Tabelle 9).

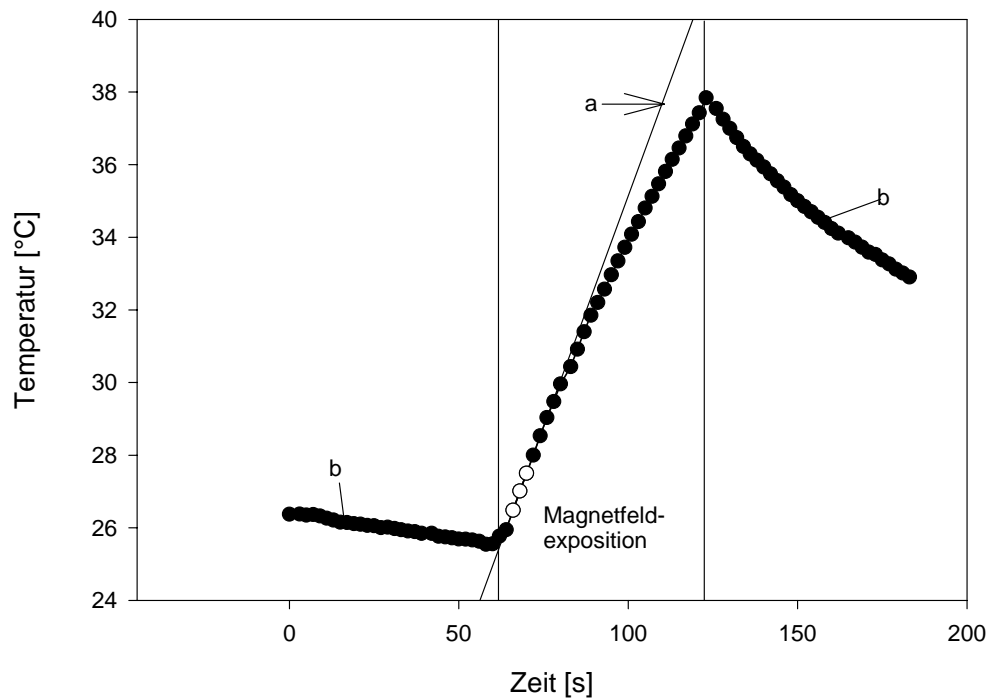


Abb. 21: Bestimmung der SAR der Magnetitprobe 5 im Magnetwechselfeld (400kHz; 6,5kA*m⁻¹)
a: Regressionsgeraden a ermittelt aus den weiß unterlegten Meßwerten
b: Temperaturverlauf außerhalb der Magnetwechselfeldes

Tab. 9: SAR – Werte der sterilen und unsterilen Magnetitprobe 5; dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen; Magnetfeldparameter: (400kHz; 6,5 kA*m⁻¹); SAR: spezifische Absorptionsrate

Substanz	SAR
Magnetitprobe 5 unsteril	26,5 ± 1,2 W*g ⁻¹
Magnetitprobe 5 steril	25,1 ± 0,7 W*g ⁻¹

Folgende Werte wurden zur Berechnung der SAR benutzt:

Masse des Ferrofluids 0,2106±0,0019 g*[0,1 ml]⁻¹,

Massenanteil Magnetit am Ferrofluid 0,01386 g*[0,1 ml]⁻¹,

Anstieg b der Regressionsgeraden a 0,4157±0,0194 (unsterile Magnetitprobe),

Anstieg b der Regressionsgeraden a 0,3940±0,0103 (sterile Magnetitprobe).

4.4.1.3 Das Ferrofluidvolumen zum Erreichen der kritischen Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen durch magnetische Thermoablation

Mit Hilfe von 0,4 ml (27,7 mg Magnetit) der Ferrofluidprobe 5 wurde nach 4-minütiger Exposition im Magnetwechselfeld ausgehend von Zimmertemperatur eine Temperaturdifferenz von 20°C gemessen. Bei einer Ausgangstemperatur von 37°C wurde in 1 ml Zellsuspension bei Zugabe der gleichen Ferrofluidmenge und bestmöglicher Isolierung nur eine Temperaturdifferenz von 16,1°C erreicht.

4.4.2 Ergebnisse der Wärmebehandlung von Zellen durch magnetische Thermoablation mittels einer ausgewählten Magnetitprobe

Zunächst wurden die Zellsuspensionen nach der Zwischenlagerung in Eis im Wasserbad auf 37°C angeglichen. Während der Magnetfeldexposition stiegen die Temperaturkurven stetig an. Die Zellsuspensionen erwärmten sich in 4 Minuten mit 26 mg Magnetitzusatz der Magnetitprobe 5 auf 53,1°C. Außerhalb des Magnetwechselfeldes kam es zu einem Abfall der Temperatur. Die Zellsuspensionen ohne Magnetitzusatz erwärmten sich während der Magnetfeldexposition nicht, sondern kühlten sich von 37°C auf 29,5°C ab. Die mittleren Temperaturverläufe mit Standardabweichungen der Magnetfeldexposition von Zellen werden in Abbildung 22 gezeigt.

Nach Behandlung der Zellen im Magnetwechselfeld und anschließender Kultivierung für 1 Woche unter Standardkulturbedingungen ergaben sich folgende Zellvitalitäten: Die aktive Zellteilungsfähigkeit der Zellen ohne Magnetitzusatz betrug $96 \pm 10\%$ im Vergleich zu unbehandelten Referenzzellen. Hingegen betrug die aktive Zellteilungsrate nach Magnetfeldexposition der Zellen mit 26 mg Magnetit nur noch $3 \pm 3\%$. Diese Ergebnisse verdeutlicht Abbildung 23.

Die Interpolation dieser Ergebnisse der Erwärmung von Zellen im Wasserbad ergab für 53°C eine aktive Zellteilungsfähigkeit von 8-10%.

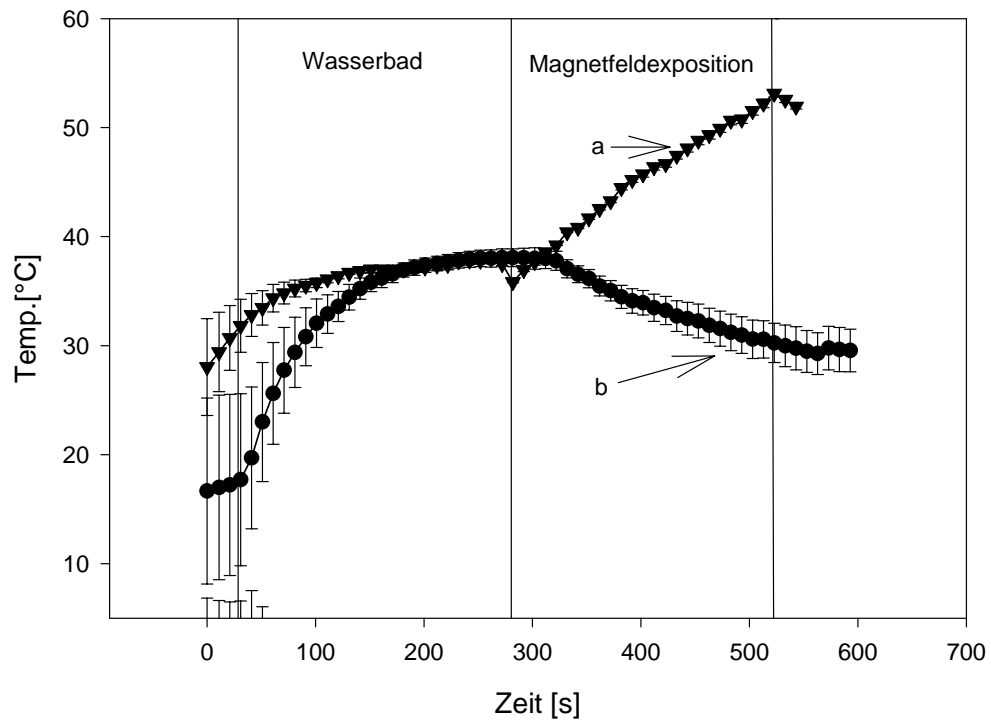


Abb. 22: Temperatur-Zeit-Kurve der magnetischen Wärmebehandlung von BT-20-Zellen ($1 \cdot 10^5$ Zellen in 1 ml Kulturmedium). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen
 Wasserbad: Angleichung der Temperatur auf 37°C
 Exposition im Magnetwechselfeld (400 kHz ; $6,5\text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$)
 a: Magnetfeldexposition der Zellen mit 26 mg Magnetit der Magnetitprobe 5
 b: Magnetfeldexposition der Zellen ohne Magnetit

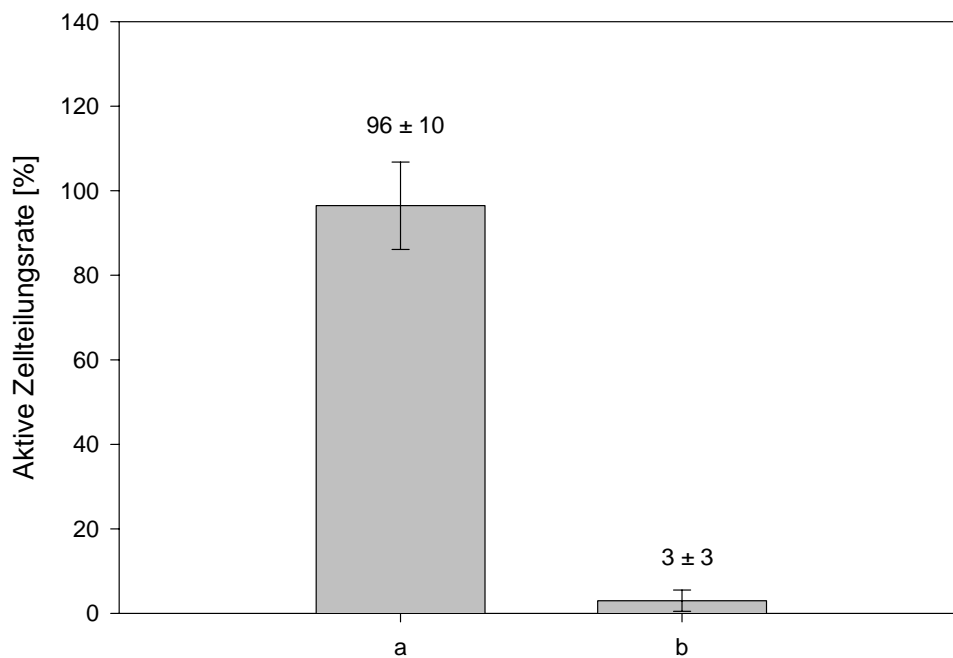


Abb. 23: Aktive Zellteilungsrate von BT-20 Zellen nach 4-minütiger magnetischer Wärmebehandlung (400 kHz ; $6,5\text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$) und anschließender Kultivierung für eine Woche unter Standardkulturbedingungen; Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen
 a: Magnetfeldexposition der Zellen ohne Magnetit
 b: Magnetfeldexposition der Zellen mit 26 mg Magnetit der Magnetitprobe 5

4.4.3 Die applizierten Hitzedosen während der Exposition von Zellen im Wasserbad und im Magnetwechselfeld

Im Wasserbad betrug die applizierte Hitzedosis bei einer Endtemperatur von 37°C $150 \pm 1,1^\circ\text{C} \cdot \text{min}$, bei 47°C $180 \pm 2,0^\circ\text{C} \cdot \text{min}$, bei 58°C $218 \pm 1,9^\circ\text{C} \cdot \text{min}$, bei 65°C $246 \pm 0,2^\circ\text{C} \cdot \text{min}$ und bei 80°C $298 \pm 2,2^\circ\text{C} \cdot \text{min}$. Die applizierte Hitzedosis für 53°C im Magnetwechselfeld betrug $179 \pm 5,7^\circ\text{C} \cdot \text{min}$ (Tabelle 10).

Tab. 10: Werte der applizierten Hitzedosen in Gegenüberstellung zu den jeweiligen Endtemperaturen während der Exposition von Zellen im Wasserbad und im Magnetwechselfeld (400kHz; $6,5\text{kA} \cdot \text{s}^{-1}$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die Hitzedosen wurden aus den Flächen unter den Temperatur-Zeitkurven (34. bis 57. Meßzyklus, siehe 3.3.2 und 3.4.2 bzw. 4.3.2 und 4.4.2) berechnet.

Endtemperatur	Applizierte Hitzedosis
37°C (im Wasserbad)	$150 \pm 1,1^\circ\text{C} \cdot \text{min}$
47°C (im Wasserbad)	$180 \pm 2,0^\circ\text{C} \cdot \text{min}$
58°C (im Wasserbad)	$218 \pm 1,9^\circ\text{C} \cdot \text{min}$
65°C (im Wasserbad)	$246 \pm 0,2^\circ\text{C} \cdot \text{min}$
80°C (im Wasserbad)	$298 \pm 2,2^\circ\text{C} \cdot \text{min}$
53°C (im Magnetwechselfeld)	$179 \pm 5,7^\circ\text{C} \cdot \text{min}$

5 Diskussion

5.1 Sterilisierung von Ferrofluiden

Als ein günstiges Verfahren zur Sterilisierung von Ferrofluiden wurde die Autoklavierung bei 121°C und 200 kPa ausgewählt. Zur Schonung der organischen Hüllen der Magnetitpartikel wurde die Sterilisationszeit von den üblichen 15 min [Lindl 1994] auf 5 min und 0 min (Momentautoklavierung) verkürzt.

Auf keinem der Agarböden (Blutagar/aerobe Bakterien; Winkleagar/gram negative Bakterien; Sabaroundagar/Pilze) konnten Kolonien von Bakterien oder Pilzen nachgewiesen werden, was eine Sterilität der nach Autoklavierung dort ausgestrichenen Ferrofluide beweist. Somit sind die verwendeten Sterilisationszeiten und –temperaturen zur Sterilisation von Ferrofluiden geeignet.

Die Ferrofluidproben wurden nicht auf anaerobe Bakterien untersucht. Da die Ferrofluidproben wie auch die Zellansätze nicht luftdicht verschlossen wurden und sich somit in der ständigen Präsenz von Sauerstoff befanden, ist das Auftreten anaerober Keime in Zellkulturen dieser Studie unwahrscheinlich. Im Hinblick auf die Anwendung der untersuchten Ferrofluide in Tierexperimenten oder am Menschen sollte die Anwesenheit von anaeroben Bakterien jedoch sicher ausgeschlossen werden.

Makroskopisch konnten bei den Magnetitproben 1 bis 4 durch die Autoklavierung (Moment- und 5 min-Autoklavierung) keine Veränderungen in bezug auf Farbe, Verklumpung und Zähigkeit festgestellt werden. Magnetitprobe 5 hingegen neigte deutlich zu Teilchenagglomerationen bzw. Verklumpung. Vermutlich kam es durch die Wärmeeinwirkung zu Reaktionen zwischen den Hüllen der einzelnen Magnetitpartikel. Dies kann grundsätzlich eine Veränderung der spezifischen Absorptionsrate (SAR) bewirken. Die SAR wird neben der Teilchengröße und der Teilchenstruktur von der Brownschen Relaxation (mechanische Drehung der Teilchen in einer Lösung [Chan et al. 1993]) und der Néelschen Relaxation (Drehung des magnetischen Vektors innerhalb eines Teilchens [Chan et al. 1993]) beeinflusst. K. Frühauf [2001] wies für größere Magnetitteilchen (>350 nm) eine Abhängigkeit der SAR vom Aggregatzustand der Trägersubstanz nach. Wird die freie Beweglichkeit von Teilchen durch ein festes Medium eingeschränkt, tritt eine geringere Wärmeproduktion durch Reibungsverluste auf (Verminderung der Brownschen Relaxation). Die Néelsche Relaxation hingegen ist nicht signifikant vom Aggregatzustand des Mediums abhängig.

Um eine Beeinflussung der SAR der Ferrofluide durch die Sterilisation auszuschließen, wurde beispielhaft die SAR der Magnetitprobe mit den günstigsten zytotoxischen Eigenschaften für das Experimentieren mit Zellen (Magnetitprobe 5) im unsterilen und sterilen Zustand bestimmt. Die

Masse des Ferrofluids (m_{FF}) und des Eisenoxidanteils (m_E) zur Berechnung der SAR wurden nach der Sterilisation nicht nochmals bestimmt, da die benötigte Menge an sterilem Ferrofluid jeweils unsteril abgefüllt wurde und die Autoklavierung in einem fest verschlossenem Gefäß erfolgte. Daher ist nicht von einer Massenänderung durch die Sterilisation auszugehen.

Die Ergebnisse zeigten einen minimalen, aber nicht signifikanten Unterschied (t-Test, $\alpha=0,01$) zwischen der SAR der sterilen ($25,1 \pm 0,7 \text{ W} \cdot \text{g}^{-1}$) und der SAR der unsterilen Magnetitprobe ($26,5 \pm 1,2 \text{ W} \cdot \text{g}^{-1}$). Daraus folgend hat die veränderte Konsistenz der Magnetitprobe 5 keinen relevanten Einfluß auf die SAR. Gleichzeitig läßt das Ergebnis vermuten, daß die Wärmeentwicklung der Magnetitprobe 5 wahrscheinlich vorwiegend auf die Nèelsche Relaxation zurückzuführen ist. Bei einer möglichen Immobilisierung der Magnetitteilchen im Tumor selbst oder durch Anlagerung an die Zellmembran ist daher nicht von einer veränderten Wärmeentwicklung auszugehen.

Um eine verbesserte Applikation ohne Verklumpung in Tumoren zu ermöglichen, sollte eine Optimierung des Sterilisationsverfahrens oder der verwendeten organischen Hüllen erfolgen. Darüber hinaus wird empfohlen, eine mengenabhängige Überprüfung der Sterilität vor In-vivo-Versuchen durchzuführen. Für die weiteren Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden Ferrofluidproben, die für 5 min bei 121°C autoklaviert wurden, verwendet.

5.2 Wechselwirkung von Magnetitpartikeln mit der Zellmembran

Die in dieser Studie dargelegten In-vitro-Untersuchungen wurden an BT-20-Zellen durchgeführt. Die BT-20-Zelllinie gehört in die Gruppe der unspezifischen dukalen Mammakarzinome [Lasfargues 1958]. Ihre Koloniebildungsfähigkeit wurde unter den gegebenen Bedingungen mit 13,3% bestimmt. Diese ist sicherlich im Vergleich zu anderen Karzinomen niedrig und spricht für ein langsames Wachstum dieser Mammakarzinomzelllinie. Ebenso sind andere etablierte Zelllinien aus der Reihe der Mammakarzinome (ZR-75-1, MDA-MB-415) nach dem Splittfaktor durch langsames Wachstum gekennzeichnet [Lörke 2001]. In Vorversuchen zur Bestimmung der Zellvitalität wurde eine für BT-20-Zellen günstige Aussaatdichte von 400 Zellen pro 8 cm^2 Wachstumsfläche ermittelt. Diese Daten stellten einen sinnvollen Kompromiß zwischen der Zelldichte und der Zählbarkeit der Kolonien in der Auswertung dar.

Die Ergebnisse zu den Wechselwirkungen zwischen Zellmembran und Magnetitpartikeln zeigen, daß prinzipiell eine Anlagerung von Magnetitpartikeln an Zellmembranen möglich ist. Eine relevante Wechselwirkung mit der Plasmamembran von BT-20-Zellen wurde bei den Magnetitproben 2, 3 und 4 beobachtet. Die Partikel der Magnetitproben 1 und 5 lagerten

sich hingegen nur minimal und sporadisch an die Zellen an. Die Anlagerung von Magnetitpartikeln an die Zellmembran war für die Magnetitproben 2, 3 und 4 zu erklären, da die organischen Hüllen dieser Magnetitproben nach Angaben der Firma Ferrofluidics [Tatarunis 1999] (Magnetitprobe 2) und Bergemann [1999] (Magnetitproben 3 und 4) positiv geladen sind. Hingegen ist die Zelloberfläche mit endständigen Gruppen negativer Ladung versehen [Kleinig et al. 1986] und es kommt zur Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Magnetitpartikeln und der Zellmembran. Die Stärke des Magnetitsaumes der Magnetitprobe 2 überraschte, da sich die positiv geladenen Teilchen gegenseitig abstoßen und nicht zusammenlagern müßten. Auch in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind kleine Agglomerationen der Magnetitteilchen erkennbar. Dieser Befund spricht für eine Störung der organischen Hülle. Daß die Agglomerationen in dieser Form bereits vor Durchführung des Experimentes vorlagen, ist möglich. Laut Herstellungsfirma tendieren die Magnetitproben 1 und 2 zu Teilchenagglomerationen [Tatarunis 1999]. Ist die Ursache experimentell bedingt, kam es möglicherweise durch die Anlagerung der Magnetitpartikel an die Plasmamembran oder durch Reaktionen mit Metaboliten des Zellstoffwechsels zu einer Dipolbildung in den organischen Hüllen der Magnetite, die Teilchen lagerten sich daraufhin aneinander an. Andererseits kann die Verwendung der Pufferlösung (PBS) zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes des gesamten Ferrofluids geführt haben und dadurch zu Ladungsverschiebungen der Hüllen. Erfolgt die Ladungsverschiebung in Richtung des isoelektrischen Punktes des Ferrofluids, wird die Ladung der Teilchen neutral und die Teilchen verklumpen. Dieser Vorgang kann irreversibel sein [Müller 2000]. Zusätzlich zu den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Plasmamembran und Magnetitpartikeln sind unspezifische Proteinbindungen zwischen Hüllbausteinen der Magnetite und Rezeptoren der Zellmembran denkbar, wie auch Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte, hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen [Günther 1996], die zu einer Anlagerung der Magnetitteilchen an die Zellen geführt haben können.

Wie oben bereits erwähnt, lagerten sich die Magnetitproben 1 und 5 nicht oder nur sporadisch an die Zellmembran an. Dieser Befund ist dadurch zu erklären, daß die Oberfläche der Magnetitprobe 1 negativ geladen [Tatarunis 1999], die der Magnetitprobe 5 neutral ist [Buske 2000]. Die sporadischen Anlagerungen werden als zufällig angesehen und Verarbeitungsartefakten während der elektronenmikroskopischen Aufarbeitung zugeschrieben.

Zusammenfassend läßt sich aus den vorliegenden Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Magnetitpartikeln und Zellmembran ableiten, daß in Abhängigkeit der Charakteristika der verwendeten Ferrofluide, vor allem der Oberflächenladung und der Beschaffenheit der Magnetithüllen, die Anlagerung an Zellstrukturen sehr unterschiedlich ist. Diese Beobachtung bestätigt die Ausführungen von Günther [1996], der sich mit verschiedenen organischen Hüllen

um Magnetitpartikel und deren Bindungsmöglichkeiten beschäftigte. Als wesentlich für die Anlagerung von Magnetitpartikel an Zellen oder Gewebe beschreibt er die Ladung und Polarität der Hüllen, die Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen sowie das Vorhandensein spezifischer funktioneller Gruppen (in Abhängigkeit vom Zielgewebe). Im Hinblick auf die klinische Anwendung der Methode der magnetischen Thermoablation zur Therapie von Brusttumoren ist daraus zu schließen, daß bei sehr starken Wechselwirkungen zwischen Zellmembran und Magnetitteilchen eine Einschränkung vor allem der Brown'schen Relaxation (mechanische Drehung von Teilchen in einer Lösung [Chan et al. 1993]) möglich ist. Gegebenenfalls ist dadurch mit einer geringeren Absorption von Energie und deren Umwandlung in Wärme im Magnetwechselfeld zu rechnen. Es ist daher sinnvoll, die Anlagerungstendenz für jedes einzelne Magnetit vor der klinischen Anwendung in In-vivo-Versuchen zu überprüfen.

5.3 Die kritische Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen durch Erwärmung im Wasserbad

Mit der Erwärmung von Zellen im Wasserbad sollte untersucht werden, ab welcher Temperatur Zellen bei kurzen Expositionszeiten von 4 min irreversibel geschädigt werden, d. h. kein Zellwachstum mehr nachweisbar ist. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die Exposition von Zellen im Wasserbad der Exposition im Magnetfeld vorgezogen, da mit geringem technischen Aufwand zunächst ein breites Temperaturspektrum abgedeckt werden konnte.

Die Temperaturmessung der Zellsuspension war wegen der Wahrung der Sterilität nicht direkt möglich. Mit einem Vorversuch für die Experimente wurde daher der Einfluß der Glaswand der modifizierten Pasteurpipette (Abb. 2) und dem darin befindlichen Wasser auf die Temperaturmessung mittels eines zweiten Thermoelements außerhalb der Pipette (Abb. 5) überprüft. Im Ergebnis wurde eine maximale Temperaturdifferenz von 0,8°C zwischen beiden Thermoelementen festgestellt. Für die in dieser Studie durchgeführten Experimente ist sie nicht relevant. Die geringe Temperaturdifferenz ist in der Wärmekapazität und dem geringen Wärmeleitwiderstand der Pipettenglaswand bzw. des darin befindlichen Wassers zu suchen.

Als Maß für die Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde die Zellteilungsaktivität in Anlehnung an die Methode von Freshney [1994] gewählt. Um eine hohe Spezifität und damit möglichst genaue Aussage über die Teilungsaktivität der Zellen zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit bereits jede Zellverdopplung als Kolonie gewertet. Färbemethoden, wie die Trypanblaufärbung oder die Neutralrotfärbung, bei welchen eine Unterscheidung in mortale und vitale Zellen über das Färbeverhalten der Zellmembran definiert wird, waren zur Bestimmung der

Zellvitalität ungeeignet. Werden Zellen erwärmt, wie es hier in einigen Experimenten der Fall war, ist mit Veränderungen der Zellmembran zu rechnen. Durch veränderte Zellmembranen wird auch die Anfärbbarkeit der Zellen verändert, und es sind keine objektiven Aussagen mehr über die Vitalität der Zellen möglich. Die oben genannten Färbemethoden waren daher für die vorliegenden Studien nicht verwendbar.

Die Ergebnisse der Erwärmung von Zellen im Wasserbad mit einer Anfangstemperatur von 37°C verdeutlichten einen kontinuierlichen Abfall der aktiven Zellteilungsfähigkeit mit steigender Behandlungstemperatur im Vergleich zu einem unbehandelten Referenzansatz. Bei der Exposition der Zellen im 37°C warmen Wasserbad war eine geringe Stimulation der Teilungsaktivität der Zellen auf $103 \pm 18\%$ im Vergleich zu dem auf Eis gelagerten Referenzansatz zu beobachten. Zum einen kann diese gering erhöhte aktive Zellteilungsfähigkeit auf Aussaatungenauigkeiten zurückgeführt werden. Andererseits ist denkbar, dass die als Kontrolle verwendeten Referenzzellen eine Verlangsamung der intrazellulären biochemischen Vorgänge erfuhren. Über eine Veränderung der Zellvitalität durch die Zwischenlagerung von Zellen für definierte Zeiträume auf Eis ist bisher in zellkulturtechnischen Arbeiten in der Literatur nichts bekannt geworden. Sie wird routinemäßig praktiziert, wie aus anderen Veröffentlichungen bekannt ist [Heisterkamp et al. 1999]. Die Lagerung von Referenzzellen bei 37°C ist ungünstig, da es zum Anheften von Zellen an die Gefäßwand kommen kann. Dies kann zu einer Verschiebung der Zellzahl bei der Aussaat führen. Hingegen ist durch die Verlangsamung der biochemischen Vorgänge bei der Lagerung auf Eis nicht mit einer Anheftung von Zellen an die Gefäßwand zu rechnen.

Bereits bei einer Temperaturerhöhung auf 47°C für 4 min war ein signifikanter Abfall der aktiven Zellteilungsfähigkeit auf $29 \pm 9\%$ im Vergleich zum Referenzansatz festzustellen. Dieser Anteil der Zellpopulation war demnach resistent gegenüber 47°C oder wurde nur reversibel geschädigt. Das bedeutet, daß das Tumorstadium mit einer Temperaturerhöhung auf 47°C beeinträchtigt werden kann, jedoch nicht zum Absterben aller Tumorzellen führt. Untersuchungen von Madersbacher et al. [1996] ergaben, daß Temperaturen (45-47°C) in diesem sogenannten Hyperthermiebereich allein nicht zu einer vollständigen irreversiblen Schädigung der Tumorzellen führen. Demnach ist bei Inkubation der Zellen über einen längeren Zeitraum nach Erwärmung auf 47°C wieder ein Anstieg der Zellteilungsaktivität denkbar. Ein weiterer Abfall der Zellzahl ist auf Grund der gesunden Morphologie der überlebenden Zellen eher unwahrscheinlich. Diese Erkenntnis stimmt mit Ergebnissen von In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen und mit der klinischen Erfahrungen der Hyperthermieranwendung in der Praxis überein, nach denen die Hyperthermie zusätzlich mit Chemo- und/oder Strahlentherapie

kombiniert wird, um eine vollständige Inaktivierung der Tumorzellen zu erreichen [Romanowski et al. 1993, Peschke et al. 1998, Mayroy et al. 1999, Seegenschmiedt et al. 1996]. Die simultane Anwendung von Hyperthermie mit Chemotherapie und/oder Radiotherapie macht Tumorzellen gegenüber Strahlen und Zytostatika empfindlicher [Wust et al. 1999]. Desweiteren gibt es Hinweise, daß wärmebehandelte Zellen vom Immunsystem besser erkannt werden [Jordan et al. 1999].

Nach der Erwärmung der Zellen auf 58°C für 4 min betrug die aktive Zellteilungsfähigkeit nur noch $1\pm 1\%$ des unbehandelten Referenzansatzes. Die Zellen erschienen verkümmert und pyknotisch. Nach Exposition der Zellen im 65°C bzw. 80°C heißen Wasserbad waren keine Zellen (nur Zellreste) und somit auch keine Zellteilungsfähigkeit mehr nachzuweisen. Nach den vorliegenden Ergebnissen liegt die Grenztemperatur für eine vollständige irreversible Zellschädigung zwischen 58°C und 65°C für eine Expositionszeit von 4 min. Dieser Bereich wird als therapeutisch wirksamer Mindesttemperaturbereich definiert. Obwohl noch 1% der Zellen nach Exposition bei 58°C aktiv teilungsfähig waren, ist davon auszugehen, daß trotzdem eine irreversible Schädigung der Zellen vorliegt. Durch Wärmeeinwirkung kann die Apoptose einer Zelle induziert werden. Apoptose beschreibt den programmierten Selbstzerstörungsmechanismus einer Zelle, ein dynamischer Prozeß, der sich über einen längeren Zeitraum hinziehen kann [Goldstein et al. 2000]. Die bei 58°C behandelten Zellen zeigten eine verkümmerte und pyknotische Morphologie. Daß die Apoptose eingesetzt hat, liegt daher nahe. Es ist davon auszugehen, daß bei einer längeren Inkubation (länger als 7 Tage) der Zellen es zu keinen weiteren Zellteilungen kommen wird. Die eindeutige Bestätigung dieser Hypothese steht noch aus. Im Gegensatz dazu fanden Heisterkamp et al. [1999] eine kritische Temperatur zur kompletten Zerstörung von Zellen zwischen 50°C und 60°C. Die Arbeitsgruppe behandelte ihre Zellen jedoch nur über 3 min mit Wärme und bestimmte die Zellvitalität unmittelbar nach der Wärmeexposition. Der Prozeß der Apoptose, der über einen längeren Zeitraum andauert, wurde hier nicht berücksichtigt.

Die toxische Wirkung von Wärme wurde mit der Anfärbung des Zytoskeletts durch die Antikörper Anti- β -Tubulin und Anti-Maus-IgG-FITC bestätigt. Die Ergebnisse deuten daraufhin, daß das Zytoskelett nach 4 min Exposition im 65°C warmen Wasserbad so stark verändert ist, daß vitale Funktionen, die vom gesunden Zytoskeletts ausgehen, wie Organisation der Organellen, Motalität der Zelle, Erhalt der Zellform und Signalübertragung [Wachsberger et al. 1989] nicht mehr aufrecht erhalten werden können. In der Literatur wurden Zytoskelettschädigungen nach langen Wärmeexpositionen bis 60 min bei 42°C bis 45°C von Coss et al. [1996], Dermietzel et al. [1992] und Wachsberger et al. [1989] beschrieben. Wachsberger et al. zeigten jedoch auch eine Reorganisation des Zytoskeletts am zweiten Tag

nach einer 15-minütigen Erwärmung bei 45°C. Ein Beweis für die irreversible Schädigung der Zellen ist demnach erst im Zusammenhang mit der Testung der aktiven Zellteilungsfähigkeit zu erhalten. Im vorliegenden Experiment wurde die aktive Zellteilungsfähigkeit nach 4-minütiger Wasserbadexposition bei 65°C mit 0% bestimmt. Damit einhergehend ist anzunehmen, daß die vorliegenden Zytoskelettveränderungen irreversibler Art sind.

5.4 Wärmebehandlung von Zellen durch magnetische Thermoablation

Vor der Anwendung von Magnetit mit Zellen im Magnetwechselfeld wurden die einzelnen Magnetitproben auf ihre Zytotoxizität gegenüber BT-20-Zellen getestet.

Die Bestimmung der Zytotoxizität war notwendig, um wachstumshemmende Einflüsse bei Experimenten mit Übertemperatur eindeutig auf die Wärmeeinwirkung zurückführen zu können und eine Überlagerung durch toxische Effekte auszuschließen.

Die Ergebnisse zeigten einen unterschiedlich starken Einfluß der einzelnen Magnetite auf die Vitalität der Zellen. Einen sehr geringen Einfluß auf das Zellwachstum hatte die Magnetitprobe 5. Hier lag die aktive Zellteilungsfähigkeit bei $92\pm 4\%$ im Vergleich zum unbehandelten Referenzansatz. Alle anderen Magnetitproben waren in bezug auf die verwendeten Mengen signifikant toxisch. Die Zellteilungsfähigkeit lag unter 40%. Die Zytotoxizität von Magnetitprobe 2 erwies sich als besonders stark, da hier gar kein Zellwachstum mehr nachzuweisen war und nur Zellreste angefärbt wurden.

Die Zytotoxizität der Magnetitproben 1 bis 4 spiegelte sich auch in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zur Anlagerung von Magnetitpartikeln an die Zellmembran (5.2) wider. Hier ließen sich verklumpte Nukleoli und verklumptes Chromatin sowie zum Teil stark geschwollene Mitochondrien als Zeichen der Zellschädigung beobachten. In der Literatur sind solche Veränderungen der Zellorganellen als Reaktion auf verschiedene zytotoxische Einflüsse (z. B. Magnetite, Wärme) beschrieben. Lacava et al. [1999] fanden kondensierte Zellkerne und durch Bläschenbildung gestörte Zytoplasmamembranen bei neutrophilen Granulozyten und Makrophagen nach Behandlung mit Magnetitpartikeln, deren organische Hülle Tartrate enthielten. Journée-de Korver et al. [1995] beschrieben kondensiertes Chromatin, lokale Ödeme, geschwollene Mitochondrien und unterbrochene Zellmembranen von geschädigten Melanozyten. Allerdings wurde hier die Zellschädigung nicht durch ein Ferrofluid, sondern durch Wärme (50°C; 0,5-3 h) verursacht.

Bei den mit Magnetitprobe 2 versetzten Zellen stellten sich das Zytoplasma und die Zellmembran völlig zerstört dar. Zellorganellen waren nicht mehr erkennbar. Dem gegenüber zeigten die mit Magnetitprobe 5 versetzten Zellen eine gesunde Morphologie mit unauffälligem

Zytoplasma und intakten Zellorganellen. Beide Ergebnisse, die des Vitalitätstests und die der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, stimmen überein (Magnetitproben 1, 2, 3, 4 sind toxisch, Magnetitprobe 5 hingegen nicht), obwohl die Expositionszeiten der Zellen mit Ferrofluid unterschiedlich waren. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Zellen nach 4-minütiger Exposition mit Magnetiten, die Zytotoxizitätstests hingegen wurden nach 10-12 minütiger Magnetitexposition und anschließender Kultivierung der Zellen über 7 Tage unter Standardkulturbedingungen ausgewertet. Es läßt sich schlußfolgern, daß die untersuchten Magnetitproben (außer Magnetitprobe 5) grundsätzlich für zukünftige Anwendungen interessant sind, sich aber bezüglich ihrer zytotoxischen Eigenschaften für die Nutzung in der magnetischen Thermoablation in der klinischen Praxis nicht eignen.

Die Ursache der zytotoxischen Eigenschaften der verschiedenen Magnetitproben kann prinzipiell in den einzelnen Bestandteilen der Ferrofluide liegen. Dazu gehören die Magnetitpartikel, die organische Hülle und die Suspensionsmatrix.

Daß die Toxizität nicht auf die Magnetitpartikel an sich zurückzuführen ist, ist indirekt bewiesen, denn Magnetit hat bereits eine medizinische Anwendung im eisenoxidhaltigen Kontrastmittel Endorem für Magnetresonanzaufnahmen [Jordan et al. 1997, Laboratoire Guerbet 1994] und wird vom menschlichen Körper gut toleriert [Marchal 1988, Laniado et al. 1995]. Pro Kilogramm Körpergewicht dürfen 1,125-1,245 mg Fe_3O_4 appliziert werden [Laboratoire Guerbet 1994].

Naheliegende Ursachen für den schädigenden Einfluß der Ferrofluide auf Zellen sind die Trägersubstanz und der pH-Wert des Dispersionsmittels. Zumindest sind die Magnetitproben 1 und 2 für technische Zwecke entwickelt worden [Schwender 1999]. Daher ist nicht davon auszugehen, daß beispielsweise auf einen für die Zellen günstigen pH-Wert von 7,4 oder die Minimierung von schädigenden Ionen, wie Sulfiden, geachtet wurde. Die genauen Zusammenhänge konnten nicht geklärt werden, da die chemische Zusammensetzung des Dispersionsmittels wie auch die der organischen Hüllen der Magnetitproben 1 und 2 nicht zugänglich sind (vom Hersteller nicht bekanntgegebene Daten). Diese Fragestellungen müssen in weiteren Experimenten geklärt und gegebenenfalls eine Optimierung für eine biologisch-medizinische Anwendung durchgeführt werden.

In der Literatur sind zahlreiche verschiedene organische Hüllen beschrieben, ihre Verträglichkeit für lebende Organismen ist unterschiedlich. Beispielsweise untersuchten Lacava et al. [1999] Eisenoxide, die Tartrate bzw. Citrate in der Hülle enthielten. In ihren In-vivo-Versuchen mit Mäusen (Verabreichung von 0,5-0,0005 M Ferrofluid) beobachteten sie Durchfallerkrankungen und Entzündungen. In In-vitro-Experimenten wiesen sie mutagene Eigenschaften der verwendeten organischen Hüllen nach. Chan et al. [1993] benutzten ein reines Magnetit in wäßriger Suspension, modifizierten es selbst mit einer Dextranhülle und wiesen keine toxische

Wirkung dieses modifizierten Magnetits an humanen Lungenkarzinomzellen und humanen Brustkarzinomzellen nach (bis 10 mg Fe_3O_4 pro ml Ferrofluid). Die von Bergemann et al. [1999] entwickelten Eisenoxidteilchen sind hingegen von einer organischen Hülle umgeben, die mit endständigen DEAE-Gruppen (Diethylaminoethyl) als Kopplungsmoleküle für weitere Wirkstoffe versehen wurden. Über die DEAE-Gruppen können Zellen, DNA-Fragmente, Zytokine und Wachstumsfaktoren markiert und getrennt werden sowie Substanzen, beispielsweise das Zytostatikum Epirubicin, transportiert werden. Andererseits gibt es Untersuchungen, nach denen endständige, freie DEAE-Gruppen in Zusammenhang mit nichtviralem Gentransfer in epithelialen Zellen eine toxische Wirkung zeigten [Abul-Hassan et al. 2000]. Die in dieser Arbeit verwendeten Magnetitproben 3 und 4 waren ebenfalls von einer organischen Hülle umgeben, die durch endständige DEAE-Gruppen charakterisiert waren [Bergemann 1999]. Beide Magnetitproben sind signifikant toxisch. Demnach scheinen hier die DEAE-Gruppen auch einen schädigenden Einfluß auf die BT-20-Zellen bewirkt zu haben, was die geringe aktive Zellteilungsrate der Zellen nach Exposition mit Magnetitprobe 3 bzw. 4 erklärt. Andererseits ist auch eine Störung des Zellmetabolismus durch die dichte Anlagerung der Magnetitpartikel an die Plasmamembran denkbar.

Wie anfangs erwähnt, war in bezug auf die Magnetitprobe 5 nur eine geringe Einschränkung der Vitalität von BT-20-Zellen zu beobachten. Die Hülle besteht aus Dextranmolekülen, der pH-Wert lag bei 6,9 [Buske 2000]. Die leichte Beeinträchtigung der Teilungsfähigkeit der Zellpopulation kann auf Aussaatungenauigkeit und eine unzureichende Angleichung des pH-Wertes auf 7,4 bei der Zugabe der leicht sauren Ferrofluidprobe trotz des im Kulturmedium enthaltenen Puffers zurückzuführen sein.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Zellvitalitätsprüfungen, daß Magnetitprobe 5 günstige Eigenschaften für die Anwendung beim Experimentieren mit lebenden Zellen aufweist. Auch bei tierexperimentellen Studien und der Anwendung in der klinischen Praxis ist davon auszugehen, daß Magnetitprobe 5 keine toxischen Nebenwirkungen beim Verlassen des Tumors, beispielsweise durch den Abtransport, verursachen wird. Für die in dieser Studie durchgeführten Experimente mit Zellen im Magnetwechselfeld wurde daher Magnetitprobe 5 ausgewählt.

Für die beispielhafte Bestimmung der Vitalität von Tumorzellen nach Wärmebehandlung mittels magnetischer Thermoablation wurde eine Zieltemperatur von 58°C nach 4 min Expositionszeit gewählt.

Ausgehend von Zimmertemperatur (22°C) wurde mit 26 mg Magnetit (0,4 ml der Magnetitprobe 5) in 1 ml Zellkulturmedium eine Temperaturerhöhung um 20°C nach 4-minütiger Exposition im Magnetwechselfeld gemessen. Bei einer Anfangstemperatur von 37°C betrug die Temperaturerhöhung trotz Wärmeisolation nur $16,1^\circ\text{C}$. Als Ursache werden Wärmeverluste

durch Wärmeleitung und Wärmeströmung vermutet. Eine Minimierung des Wärmeverlustes ist nur mit weiteren sehr aufwendigen Isolierungsapparaturen möglich.

Grundsätzlich ist das Problem des Wärmeverlustes aus In-vivo-Versuchen und Wärmebehandlungen von Tumorgewebe bekannt [Jordan et al. 1997], da es ebenso im Körper zu Wärmeverlusten durch das umliegende Gewebe und das zirkulierende Blut kommt. Beispielsweise ist bei der Behandlung von Lebertumoren mittels Radio-Frequency-Thermoablation von einem Wärmeabtransport auszugehen, da die Leber gut vaskularisiert ist [Drenckhahn et al. 1994]. Wegen der vergleichsweise geringen Vaskularisierung der Brust und dem reichlich vorhandenen Fettgewebe, welches als Isolator angesehen werden kann, ist bei der Behandlung von Tumoren der Mamma mit diesem Problem weniger zu rechnen.

Die aktive Zellteilungsrate nach Erwärmung von BT-20-Zellen im Magnetwechselfeld von 37°C auf 53,1°C mittels 26 mg der Magnetitprobe 5 in 1 ml Zellsuspension betrug $3 \pm 3\%$ des unbehandelten Referenzansatzes. Nach Interpolierung der Daten aus den Versuchen mit Zellen im Wasserbad wurde für 53°C eine aktive Zellteilungsfähigkeit von 8 bis 10% gefunden. Im Vergleich dazu ist die aktive Zellteilungsfähigkeit der Zellen nach Magnetfeldbehandlung geringfügig niedriger. Dies kann auf Aussaatungenauigkeiten und eine Effektüberlagerung der thermischen Wirkung mit einer Beeinträchtigung des Zellmetabolismus auf Grund der minimalen (sporadischen) Anlagerung der Magnetitprobe 5 an die Tumorzellen zurückgeführt werden.

Um beide Erwärmungsmethoden besser miteinander vergleichen zu können, wurde die applizierte Hitzedosis bestimmt. Die applizierte Hitzedosis stellt die Fläche unter der zeitabhängigen Temperaturkurve während der Wärmeexposition dar (Abb. 17 und Abb. 22).

Beim Vergleich der applizierten Hitzedosen im Wasserbad und im Magnetwechselfeld fällt auf, daß die applizierte Hitzedosis der magnetischen Erwärmung von Zellen auf 53°C ($179 \pm 5,7^\circ\text{C} \cdot \text{min}$) der applizierten Hitzedosis der Erwärmung von Zellen im Wasserbad auf 47°C ($180 \pm 2^\circ\text{C} \cdot \text{min}$) entspricht. Folglich wäre bei gleichen applizierten Hitzedosen auch eine gleiche aktive Zellteilungsrate der Zellen nach Exposition zu erwarten gewesen. Tatsächlich ist die aktive Zellteilungsrate der Zellen nach Wasserbadexposition bei 47°C ($29 \pm 9\%$) um ein etwa 10faches höher im Vergleich zur Exposition der Zellen im Magnetwechselfeld bei 53°C ($3 \pm 3\%$). Die Ursachen hierfür sind spekulativ. Einerseits ist bekannt, daß die verschiedenen Proteine einer Zelle unterschiedliche Denaturierungstemperaturen aufweisen [Lepock et al. 1993], d. h. die Thermostabilität von Proteinen unterschiedlich ist und bei vermehrt vorhandenen thermostabileren Proteinen in einer Zelle eine Temperatur von 47°C zur Zellschädigung nicht ausreicht. Andererseits ist es denkbar, daß es durch die Anwesenheit von umhüllten Magnetitpartikeln zu einer Potenzierung der Erwärmungseffekte gekommen ist. Die Mechanismen hierzu sind unklar. In der Literatur ist der potenzierende Einfluß von Wärme in

Zusammenhang mit anderen zellzerstörenden Mechanismen bekannt. Willnow et al. [1996] wiesen eine Potenzierung der zytotoxischen Wirkung bei gleichzeitiger Anwendung von Hyperthermie und verschiedenen Zytostatika im Vergleich zu deren Einzelanwendung für den Bereich der Hyperthermie nach. Wust et al. [1999] beschrieben einen thermischen Verstärkungsfaktor von 4 bis 5 bei der simultanen Anwendung von Radiotherapie und Hyperthermie. Weiterhin ist zu bedenken, daß die Magnetitreste nach der Magnetfeldexposition methodisch bedingt erst nach ca. 12 h vollständig entfernt werden konnten. Ein Einfluß seitens dieser Magnetitreste auf das Zellwachstum kann daher nicht sicher ausgeschlossen werden.

Anhand der Datenlage scheint die magnetische Thermoablation ein tendenziell stärkeres zellschädigendes Potential aufzuweisen im Vergleich zur Erwärmung von Zellen mittels Wasserbad. Die hierzu dargestellten Hypothesen müssen überprüft werden.

Chan et al. [1993] und Jordan et al. [1999] untersuchten ebenfalls den zytotoxischen Effekt von Wärme auf Zellen durch Exposition im Wasserbad im Vergleich zur Exposition der Zellen im Magnetwechselfeld mit Eisenoxiden. Beide Forschungsgruppen führten ihre Untersuchungen für den Bereich der Hyperthermie durch. Sie wiesen im Gegensatz zu den hier dargelegten Ergebnissen eine Vergleichbarkeit der beiden Erwärmungsmethoden nach.

Der Einfluß des Magnetwechselfeldes ($H=400\text{ kHz}$; $f=6,5\text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$) allein, also ohne Magnetit, auf die aktive Zellteilungsrate war minimal. Sie betrug $96\pm 10\%$ der Referenzzellen und wird als nicht signifikant betrachtet. Die hohe Standardabweichung von 10% kann auf Aussaatungenauigkeiten und eventuelle Anheftungen von einzelnen Zellen an die Wand des EppendorfgeläÙes während der Exposition bei 37°C zurückgeführt werden. Chan et al. [1993] untersuchten ebenfalls die Wirkung des Magnetfeldes ($f=0,15\text{--}1,1\text{ MHz}$; $H=8\text{--}12,5\text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$) auf Zellen. Sie exponierten Zellen für 24 Stunden im Magnetfeld und fanden keine zytotoxischen Effekte.

In weiteren Untersuchungen sollten die dargelegten Ergebnisse in In-vivo-Versuchen bestätigt werden. Ebenso gilt es Fragen zur Magnetitverteilung im Tumor zu klären, wie auch die Temperaturentwicklung genau durch das Aufnehmen von Temperaturkurven zu evaluieren, um eine gesicherte Basis für konkrete klinische Studien und Therapiepläne zu legen. Im Hinblick auf spätere klinische Anwendungen am Patienten sollte die gefundene therapeutische Mindesttemperatur am Tumorrand und in einem entsprechenden Sicherheitsabstand zur gesunden Umgebung in Analogie zur derzeitigen chirurgischen Behandlung erreicht werden.

Zusammenfassend konnten die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen wichtige Grundlagen für die Erprobung der Methode der magnetischen Thermoablation unter In-vivo-Bedingungen sichern. Mit der Autoklavierung (121°C ; 5 min; 200 kPa für 0,4 ml Ferrofluid) wurde eine Möglichkeit der Sterilisierung von Ferrofluiden gefunden. Die

elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen, daß prinzipiell eine Anlagerung von Magnetiten an die Zellmembran von Tumorzellen möglich ist und dies gegebenenfalls zu einer Verschiebung der SAR führen kann. Desweiteren bestätigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Ergebnisse der zytotoxikologischen Untersuchungen verschiedener Magnetite. Von den untersuchten Magnetitproben erwies sich nur die Magnetitprobe 5 als geeignet, die Untersuchungen in In-vivo-Versuchen fortzuführen. Die kritische Temperatur zur irreversiblen Schädigung von BT-20-Zellen bei einer Expositionszeit von 4 min wurde sowohl für die Erwärmung im Wasserbad wie auch im Magnetwechselfeld auf 58°C bis 65°C bestimmt. Sie sollte als therapeutische Mindesttemperatur bei späteren klinischen Anwendungen für das gesamte Tumoreal berücksichtigt werden.

6. Zusammenfassung

Unter den vielen verschiedenen Behandlungsmethoden von Tumoren wird der Behandlung mittels Wärme immer mehr Bedeutung beigemessen. Neben der Hyperthermie, die oft in Kombination mit Chemo- oder/und Radiotherapie durchgeführt wird und Temperaturen bis zu 47°C anstrebt, werden derzeit auch verschiedene Thermoablationsverfahren mit Temperaturen bis zu 100°C erprobt. Eines dieser Verfahren ist die magnetische Thermoablation, bei welcher kurze Expositionszeiten und hohe Temperaturen (>50°C) angestrebt werden. Ziel dieser Methode ist es, Eisenoxidpartikel (speziell Magnetit) im Tumor anzureichern und mittels eines externen Magnetwechselfeldes die einzelnen Teilchen anzuregen. Dabei absorbieren sie Energie, welche in Wärme umgewandelt wird. Dadurch es kommt zu einer fokussierten Schädigung des Tumors.

Bisher ungeklärt blieb der Aspekt, welche (kritische) Temperatur für kurze Expositionszeiten (4 min) erreicht werden muß, um Tumorzellen irreversibel zu schädigen. Zur Etablierung der magnetischen Thermoablation in der klinischen Praxis wurde diese Fragestellung in der vorliegenden Arbeit anhand von In-vitro-Untersuchungen an einer humanen Adenokarzinomzelllinie der Mamma (BT-20) geklärt. Die 5 dafür verwendeten Ferrofluide sind kolloidal suspendierte Eisenoxidpartikel (speziell Magnetit), die von einer organischen Hülle umgeben sind.

Vorraussetzung für die Anwendung der Ferrofluide im medizinisch-biologischen Bereich an Zellen war die Sterilität der Ferrofluide. Unter Berücksichtigung der empfindlichen organischen Hüllen wurde die Sterilität mittels Autoklavierung geringer Probenmengen (0,1-0,4 ml) bei 121°C für 5 min erreicht und mittels Ausstrichen der sterilisierten Ferrofluide auf verschiedenen Agarböden (Blut-, Winkle-, Sabaroundagar) überprüft.

Um eine Basis für die Temperaturmodellierung am Tumorort zu erhalten, wurde die Anlagerung der Magnetitpartikel an die Zellmembran untersucht. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, daß prinzipiell eine Anlagerung von Magnetitpartikeln an die Zellmembran möglich ist. Ob es zu einer Wechselwirkung zwischen Plasmamembran und Magnetitteilchen kommt, ist je nach verwendeter Magnetitprobe unterschiedlich und vor allem von der Ladung und Struktur der organischen Hülle abhängig. Es wird postuliert, daß die Anlagerung von Magnetitpartikeln an die Zellmembran auf Grund von Reibungsverlusten zu einer Veränderung der Wärmeentwicklung der Magnetite im Magnetwechselfeld führen kann, und damit auch zu Abweichungen zwischen der unter In-vitro-Bedingungen vorhergesagten spezifische Absorptionsrate (SAR) und der unter In-vivo-Bedingungen zu erreichenden SAR. Die spezifische Absorptionsrate beschreibt die auf Grund magnetischer Verluste erfolgende

Temperaturänderung innerhalb einer bestimmten Zeit bezogen auf eine definierte Masse Eisenoxid.

In vorbereitenden Versuchen für die magnetische Erwärmung von Zellen wurde ein Thermoelement und eine Apparatur zur sterilen Temperaturmessung von Zellsuspensionen konzipiert. Beispielhaft wurde die SAR einer ausgewählten Magnetitprobe bestimmt. Desweiteren wurde die zytotoxikologische Verträglichkeit der angewendeten Magnetitproben untersucht, um wachstumshemmende Einflüsse eindeutig auf die Wärmeeinwirkung zurückführen zu können. Zur Beurteilung der Vitalität der Zellen wurde die aktive Zellteilungsrate in Anlehnung an die Methode der Koloniebildungsfähigkeit bestimmt. Von fünf untersuchten Magnetitproben wurde nur bei einer Magnetitprobe (Magnetitprobe 5) keine relevante zytotoxische Wirksamkeit gefunden. Als Ursache für die Zytotoxizität der anderen Magnetitproben werden die Suspensionsmatrix, endständige DEAE-Gruppen in den organischen Hüllen und die Besetzung von für den Zellmechanismus wichtigen Rezeptoren verantwortlich gemacht.

Auf Grund des geringeren technischen Aufwandes wurde die kritische Temperatur zur irreversiblen Schädigung von Zellen bei einer 4-minütigen Expositionszeit durch Erwärmung von Zellen im Wasserbad evaluiert und auf 58°C bis 65°C bestimmt. Die Zellschädigung wurde anhand einer Zytoskelettanfärbung (Tubulin) dargestellt.

Unter vergleichbaren Versuchsbedingungen wurden beispielhaft Zellen mit 26 mg Magnetit der Magnetitprobe 5 durch Exposition im Magnetwechselfeld (400 kHz; 6,5 kA*m⁻¹) auf 53°C erwärmt. Die Ergebnisse der Erwärmung von Zellen im Wasserbad wurden mit den Ergebnissen der Erwärmung von Zellen im Magnetwechselfeld interpoliert und die applizierten Hitzedosen als Maß für die zugeführte Wärmemenge in Abhängigkeit zur Zeit berechnet. Aus den Ergebnissen kann geschlußfolgert werden, daß die magnetische Thermoablation tendenziell ein stärkeres zellschädigendes Potential aufweist im Vergleich zur Erwärmung von Zellen im Wasserbad. Die möglichen Ursachen hierfür sind spekulativ und müssen überprüft werden.

Im Hinblick auf spätere klinische Anwendungen der magnetischen Thermoablation wird der Mindesttemperaturbereich von 58°C bis 65°C im Tumorgewebe und insbesondere am Tumorrand vorgeschlagen.

7. Literaturverzeichnis

Abul-Hassan, K.; Walmsley, R.; Boulton, M. (2000). Optimization of non-viral transfer of human primary retinal pigment epithelial cells. *Current-eye-research* **20**, 361-366.

Andrä, W. (1998). Magnetic Hyperthermia. In *Magnetism in Medicine*, eds. Andrä, W. & Nowok, H., pp. 455-470. Wiley-VCH, Berlin/Weinheim/New York.

Andrä, W. (1999). persönliche Mitteilung. IPHT e.V., Winzerlaer Straße 10, D-07745 Jena, Deutschland.

Ardenne, A. von (1997). persönliche Mitteilung. Von Ardenne Klinik, Zeppelin-Str.8, 01324 Dresden, Deutschland.

Ardenne, M. von (1994). Principles and concept 1993 of the Systemic Cancer Multistep Therapy (sCMT). Extreme whole-body hyperthermia using the infrared-A technique IRATHERM 2000--selective thermosensitisation by hyperglycemia--circulatory back-up by adapted hyperoxemia. *Strahlenther Onkol* **170**, 581-589.

Batzler, W. U.; Baumgardt-Elms, C.; Eisinger, B.; Lehnert, M.; Schön, D.; Schütz, J.; Stegmaier, Ch. (1997). *Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends*, pp. 32-33. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken.

Bergemann, C. (2000). persönliche Mitteilung Chemagen colloids, Bamberger Straße 51, 10777 Berlin, Deutschland.

Bergemann, C.; Müller-Schulte, D.; Oster, J.; Brassard, L.; Lübke, A. S. (1999). Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications. *Journal of magnetism and magnetic materials* **194**, 45-52.

Böhm, T.; Hilger, I.; Müller, W.; Reichenbach, J. R.; Fleck, M.; Kaiser, W. A. (2000). Saline-Enhanced Radiofrequency Ablation of Breast Tissue – An In Vitro Feasibility Study. *Investigative Radiology* **35**, 149-157.

Böhm, T.; Malich, A.; Reichenbach, J. R.; Fleck, M.; Kaiser, W. A. (2001). Percutaneous radiofrequency (rf) thermal ablation of rabbit tumors embedded in fat: a model for rf ablation of breast tumors [In Process Citation]. *Investigative Radiology* **36**, 480-486.

Brücker, C.; Sieg, P. (1999). Effekt von Carboplatin und Ifosfamid kombiniert mit lokaler Hyperthermie auf menschliche Mundhöhlenkarzinome im Tiermodell. *Mund Kiefer GesichtsChir* **3**, 144-146.

Buske, N. (2000). persönliche Mitteilung Mediport Kardiotechnik GmbH, Wiesenweg 10, 12247 Berlin

Chan, D. C. F.; Kirpotin, D. B.; Bunn, P. A. (1993). Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer. *Journal of magnetism and magnetic materials* **122**, 374-378.

Coss, R. A.; Linnemans, W. A. M. (1996). Response of the microtubular cytoskeleton following Hyperthermia as a prognostic indicator of survival of chinese hamster ovary cells. *Int.J.Radiation Oncology Biol.Phys.* **34**, 403-410.

Dermietzel, R.; Streffer, C. (1992). The cytoskeleton and proliferation of melanoma cells under hyperthermal conditions. A correlative double immunolabelling study. *Strahlenther Onkol* **168**, 593-602.

Donegan, L.; Spralt, J. S. (1988). Introduction to the History of Breast Cancer. In *Cancer of the Breast* pp. 1-15. W. B. Saunders Company, Philadelphia.

Drenckhahn, D.; Fahimi, H. D.; Fleischhauer, K. (1994). Leber und Gallenblase. In *Anatomie*, eds. Drenckhahn, D. & Zenker, W.; 15. Auflage ed., pp. 901-925. Urban & Schwarzenberg, München.

Elias, D.; Cavalcanti, A.; de Baere, T.; Roche, A.; Lasser, P. (1999). Long-term oncological results of hepatectomy performed after selective portal embolization. *Ann-Chir.* **53**, 559-564.

Felix, R.; Langer, R.; Langer, M. (1991). *Klinische Radiologie*, pp. 476. Walter de Gruyter, Berlin/New York.

Folkman, J. (1990). Die Gefäßversorgung von Tumoren. In *Krebs - Tumoren, Zelle, Gene*, 4. Auflage ed. Schirmacher, V., pp. 134-138. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg.

Formeln und Tabellen (1993). *für die Sekundarstufen I und II*, 3. Auflage ed., paetec Gesellschaft für Bildung und Technik GmbH, Berlin.

Freshney, R. J. (1994). *Culture of animal cells - A Manual of Basic Technique*, 3. Auflage ed. Wiley-Liss, New York.

Frühauf, K. (2001). Evaluierung von temperaturrelevanten Parametern zur lokalen Erwärmung von Geweben mittels magnetischer Thermoablation (Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, 72 Seiten vorgelegt, im Druck.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Gage, A. A. (1998). History of Cryosurgery. *Semin. Surg. Oncol.* **14**, 99-109.

Gilchrist, R. K.; Medal, R.; Shorey, W. D. (1957). Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann.Surg.* **146**, 596-606.

Goldberg, S. N.; Gazelle, G. S.; Compton, C. C.; Mueller, P. R.; McLoud, T. C. (1996). Radio-Frequency Tissue Ablation of VX2 Tumor Nodules in the Rabbit Lung. *Acad. Radiol.* **3**, 929-935.

Goldstein, J. C.; Kluck, R. M.; Green, D. R. (2000). A single cell analysis of apoptosis. Ordering the apoptotic phenotype. *Ann N Y Acad Sci* **926**, 132-141.

Gordon, R. T.; Hines, R. J.; Gordon, D. (1979). A biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations. *Medical Hypothesis* **5**, 83-102.

Günther, D. (1996). Tumor-Diagnostik, Therapie und Drug-Targeting mit magnetischen Flüssigkeiten. *Pharmazie in unserer Zeit* **25**, 130-134.

Hahn, G. M. (1982). Introduction - Historical and General Commands. In *Hyperthermia and Cancer* pp. 1-5. Plenum Press, New York.

Heisterkamp, J.; van Hillegersberg, R.; Ijzermans, J. N. M. (1999). Critical Temperature and Heating Time for Coagulation Damage: Implications for Interstitial Laser Coagulation (ILC) of Tumors. *Lasers in Surgery and Medicine* **25**, 257-262.

Hergt, R.; Andrä, W.; d'Ambly, C. G.; Hilger, I.; Kaiser, W. A.; Richter, U.; Schmiedt, H. G. (1998). Physical Limits of Hyperthermia Using Magnetite Fine Particles. *IEEE Transactions on Magnetism* **34**, 3745-3754.

Hilger, I.; Andrä, W.; Bähring, R.; Daum, A.; Hergt, R.; Kaiser, W. A. (1997). Evaluation of Temperature Increase with Different Amounts of Magnetite in Liver Tissue Samples. *Investigative Radiology* **32**, 705-712.

Hilger, I.; Hergt, R.; Kaiser, W. A. (2000). Effects of magnetic thermoablation in muscle tissue using iron oxide particles: an in vitro study. *Investigative Radiology* **35**, 170-179.

Hilger, I.; Andrä, W.; Hergt, R.; Hiergeist, R.; Schubert, H.; Kaiser, W. A. (2001). Electromagnetic heating of breast tumors in interventional radiology: in vitro and in vivo studies in human cadavers and mice. *Radiology* **218**, 570-575.

Jacobi (1997). persönliche Mitteilung, Universität-Klinikum, Theodor-Stern-Kai 7, 60325 Frankfurt, Deutschland.

Jordan, A. (1993). Magnetfeld-Ferrit-Hyperthermie (MFH). 34-41. 1993. Strahlenklinik Freie Universität Berlin, Deutschland.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Jordan, A.; Wust, P.; Scholz, R.; Tesche, B.; Fähling, H.; Mitrovics, T.; Vogl, T.; Cervos Navarro, J.; Felix, R. (1996). Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vivo. *Int J Hyperthermia* **12**, 705-722.

Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fähling, H.; Krause, J.; Wlodarczyk, W.; Sander, B.; Vogl, Th.; Felix, R. (1997). Effects of Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo. *Int J Hyperthermia* **13**, 587-605.

Jordan, A.; Scholz, R.; Schnoy, N.; Wust, P.; Maier-Hauff, K.; Felix, R. (1997). Differential endocytosis of magnetic fluid particles into human primary glioblastoma, neuronal and fibroblast cells in vitro. *Europ. J. Cell Biol.* **74**, 32.

Jordan, A.; Wust, P.; Scholz, R.; Föhling, H.; Krause, J.; Felix, R. (1997). Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH). In *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, eds. Häfeli et al. Plenum Press New York.

Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Föhling, H.; Felix, R. (1999). Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *Journal of magnetism and magnetic materials* **201**, 413-419.

Journée-de Korver, J. G.; Oosterhuis, J. A.; Vrensen, G. F. J. M. (1995). Light and electron microscopic findings on experimental melanomas after hyperthermia at 50°C. *Melanoma Research* **5**, 393-402.

Kayser, F. H. (1998). Allgemeine Aspekte der medizinischen Mikrobiologie. In *Medizinische Mikrobiologie*, 9. Auflage ed., pp. 2-42. Thieme, Stuttgart.

Kaiser, W. A.; Zeitler, E. (1989). MR imaging of the breast: fast imaging sequences with and without Gd-DTPA. Preliminary observations. *Radiology* **170**, 681-686.

Kaiser, W. A.; Dietrich, K.; Reiser, M.; Krebs, D. (1993). Moderne Diagnostik der Mamma. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **53**, 1-14

Kaiser, W. A. (1994). False-Positive Results In Dynamic MR Mammography. *MRI Clinics of North America* **2**, 539-555.

Kleinig, H.; Sitte, P. (1986). *Zellbiologie - Ein Lehrbuch*, 2. Auflage ed., pp.72, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Küster, F. W. (1958). *Logarithmische Rechentafeln für Chemiker, Pharmazeuten, Mediziner und Physiker*, 83. Auflage ed., pp. 115. Verlag Walter de Gruyter & Co, Berlin.

Laboratoire Guerbet (Hersteller). Beipackzettel Endorem. 1994.
Ref Type: Pamphlet

Lacava, Z. G. M.; Azevedo, R. B.; Lacava, L. M.; Martins, E. V.; Garcia, V. A. P.; Rébula, C. A.; Lemos, A. P. C.; Sousa, M. H.; Tourinho, F. A.; Morais, P. C.; Da Silva, M. F. (1999). Toxic effects of ionic magnetic fluids in mice. *Journal of magnetism and magnetic materials* **194**, 90-95.

Lancaster, C.; Toi, A.; Trachtenberg, J. (1999). Interstitial microwave thermoablation for localized prostate cancer. *Urology* **53**, 828-831.

Laniado, M.; Chachuat, A. (1995). Verträglichkeitsprofil von Endorem. *Radiologe* **35**, 266-270.

Larson, T. R.; Collins, J. M.; Corica, A. (1998). Detailed interstitial temperature mapping during treatment with a novel transurethral microwave thermoablation system in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol* **159**, 258-264.

Lasfargues, E. A.; Ozzello, L. (1958). Cultivation of Human Breast Carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* **21**, 1131-1147.

Lepock, J. R.; Frey, H. E.; Ritchie, K. P. (1993). Protein Denaturation in Intact Hepatocytes and Isolated Cellular Organelles During Heat Shock. *The Journal of Cell Biology* **122**, 1267-1276.

Lieneweg, F. (1976). Elektrische Thermometer. In *Handbuch der technischen Temperaturmessung*, Verlag Vieweg, Braunschweig, pp. 52-105.

Lin, S. M.; Lin, D. Y.; Lin, C. J. (1999). Percutaneous ethanol injection therapy in 47 cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma 5 cm or less: a long term result. *Int-J-Clin-Pract* **53**, 257-262.

Lindl, T.; Bauer, J. (1994). *Zell- und Gewebekultur*, 3. Auflage ed., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Livraghi, T.; Goldberg, S. N.; Monti, F.; Bizzini, A.; Lazzaroni, S.; Meloni, F.; Pellicanó, S.; Solbiati, L.; Scott Gazelle, G. (1997). Saline-enhanced Radio-Frequency Tissue Ablation in the Treatment of Liver Metastases. *Radiology* **202**, 205-210.

Lörke (2001). persönliche Mitteilung. Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimerfeld 280, 69120 Heidelberg, Deutschland.

Luderer, A. A.; Borrelli, N. F.; Panzarino, J. N. (1983). Glass-ceramic-mediated, magnetic-field-induced localized hyperthermia: response of a murine mammary carcinoma. *Radiat Res* **94**, 190-198.

Lübbe, A. S.; Bergemann, C.; Huhnt, W.; Fricke, T.; Riess, H.; Brock, J. W.; Huhn, D. (1996). Preclinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: Tolerance and Efficacy. *Cancer Research* **56**, 4694-4701.

Madersbacher, S.; Marberger, M. (1996). Minimal invasive therapy of benign prostatic hyperplasia. *Wien-Med-Wochenschr.* **146**, 169-175.

Madersbacher, S.; Grobl, M.; Kramer, G.; Dirnhof, S.; Steiner, G. E.; Marberger, M. (1998). Regulation of heat shock protein 27 expression of prostatic cells in response to heat treatment. *Prostate.* **37**, 174-181.

Marchal, G.; Van-Hecke, P.; Demaerel, P.; Decrop, E.; Kennis, C.; Baert, A. L.; van-der-Schueren, E. (1989). Detection of liver metastases with superparamagnetic iron oxide in 15 patients: results of MR imaging at 1.5 T. *American Journal of Roentgenology* **152**, 771-775

Mauroy, B.; Bonnal, J. L.; Prevost, B.; Chive, M.; Lhotellier, V.; Sozanski, J. P.; Vanseymortier, L.; Stefaniak, X. (1999). Study of the synergy of microwave

hyperthermia/intravesical chemotherapy in the prevention of the recurrences of superficial tumors of the bladder. *Prog Urol* **9**, 69-80.

McGahan, J. P.; Browning, P. D.; Brock, J. M.; Tesluk, H. (1990). Hepatic Ablation Using Radiofrequency Electrocautery. *Investigative Radiology* **25**, 267-270.

Müller, R. (2000). persönliche Mitteilung. IPHT e.V., Winzerlaer Straße 10, 07745 Jena, Deutschland.

Olausson, M.; Friman, S.; Johanson, V.; Nilsson, O.; Wangberg, B.; Ahlman, H. (1999). Liver transplantation in neuroendocrine tumors prolongs symptom-free period, might also be cure. *Lakartidningen* **96**, 3783-3786.

Pantazis, P.; Han, Z.; Wyche, J. (1999). Schedule-dependent efficiency of thermochemotherapy in vitro with etoposide and heating at 43 degrees C. *Anticancer Res* **19**, 995-998.

Peschke, P.; Heimbürg, S.; Wolber, G.; Zuna, I.; Hahn, E. W. (1998). Improved therapeutic response by distinct timing of multiple heat treatments during interstitial radiation in the Dunning R3327 prostate tumor model. *J Cancer Res Clin Oncol* **124**, 172-178.

Peters (2001). persönliche Mitteilung. Guerbet GmbH, Otto-Volger-Straße 11, Sulzbach, Deutschland.

Pohlers, M.; Wolff, G. (1994). Hyperthermie in der Krebstherapie. *Z-ärztl-Fortbild-Jena* **88**, 115-117.

Polk, W.; Fong, Y.; Karpeh, M.; Blumgart, L. H. (1995). Hepatic Cryotherapy for Cancer: a review and critique. *HBP Surg.* **9**, 118-120.

Pschyrembel (1994). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 257. Auflage ed., Verlag Walter de Gruyter, Berlin. pp. 683.

Rand, W. R.; Snow, H. D.; Elliott, D. G.; Snyder, M. (1981). Thermomagnetic surgery for cancer. *Appl Biochem Biotechnol* **6**, 265-272.

Roggan, A.; Beuthan, J.; Schründer, S.; Müller, G. (1999). Diagnostik und Therapie mit dem Laser. *Physikalische Blätter* **55**, 25-30.

Romanowski, R.; Schott, C.; Issels, R.; Klingebiel, T.; Treuner, J.; Jurgens, H.; Gobel, U.; Goldschmitt-Wuttge, B.; Feldmann, H.; Haas, R.; et.al. (1993). Regional hyperthermia with systemic chemotherapy in children and adolescents: feasibility and clinical follow-up of 34 intensively pretreated patients with prognostically unfavorable tumor diseases. *Klin-Padiatr.* **205**, 249-256.

Rossi, S.; Fornari, F.; Buscarini, L. (1993). Percutaneous Ultrasound-guided Radiofrequency Electrocautery for the Treatment of Small Hepatocellular Carcinoma. *J. Intervent. Radiol.* **8**, 97-103.

Schwender (1999). persönliche Mitteilung Ferrofluidics GmbH, Hohes Gestade 14, 72622 Nörtingen, Deutschland.

Seegenschmiedt, M. H.; Klautke, G.; Walther, E.; Feldmann, H. J.; Katalinic, A.; Stuschke, M.; von Lieven, H.; Vaupel, P. (1996). Water filtered infrared-A-hyperthermia combined with radiotherapy in advanced and recurrent tumors. Initial results of a multicenter phase I-II study. *Strahlenther Onkol* **172**, 475-484.

Solbiati, L.; Ierace, T.; Goldberg, S. N.; Sironi, S.; Livraghi, T.; Fiocca, R.; Servadio, G.; Rizzato, G.; Mueller, P. R.; Del Maschio, A.; Scott Gazelle, G. (1997). Percutaneous US-guided Radio-Frequency Tissue Ablation of Liver Metastases: Treatment and Follow-up in 16 Patients. *Radiology* **202**, 195-203.

Solbiati, L.; Goldberg, S. N.; Ierace, T.; Livraghi, T.; Meloni, F.; Dellanoce, M.; Sironi, S.; Scott Gazelle, G. (1997). Hepatic Metastases: Percutaneous Radio-Frequency Ablation with Cooled-Tip Electrodes. *Radiology* **205**, 367-373.

Solbiati, L.; Ierace, T.; Cova, L.; Dellanoce, M.; Marelli, P. (1999). Percutaneous ethanol injection of autonomously functioning thyroid nodule. *Rays* **24**, 348-357.

Solymosi, T.; Erdei, A.; Nagy, D.; Gal, I. (1999). Percutaneous ultrasound-guided ethanol sclerotherapy of autonomous thyroid nodules. *Orv-Hetel.* **140**, 2161-2165.

Steinhausen, D.; Mayer, W. K.; Ardenne, M. von (1994). Evaluation of systemic tolerance of 42.0 degrees C infrared-A whole-body hyperthermia in combination with hyperglycemia and hyperoxemia. A Phase-I study. *Strahlenther Onkol* **170**, 322-334.

Tabár, L.; Fagerberg, G.; Day, N. E.; Duffy, S. W.; Kitchin, R. M. (1992). Breast cancer treatment and natural history: new insights from results of screening. *Lancet* **339**, 412-414.

Takayasu, K.; Muramatsu, Y.; Asai, S.; Muramatsu, Y.; Kobayashi, T. (1999). CT fluoroscopy-assisted needle puncture and ethanol injection for hepatocellular carcinoma: a preliminary study. *AJR-Am-J-Roentgenol* **173**, 1219-1224.

Tatarunis (1999). persönliche Mitteilung Ferrofluidics Corporation, 40 Simon Street, Nashua, NH 03061, United States.

Urano, M.; Kuroda, M.; Nishimura, Y. (1999). For the clinical application of the thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int J Hyperthermia* **15**, 79-107.

Wachsberger, P. R.; Coss, R. A. (1990). Effects of hyperthermia on the cytoskeleton and cell survival in G1 and S phase Chinese hamster ovary cells. *Int J Hyperthermia* **6**, 67-85.

Wellhöner, H. H. (1997). *Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Auflage ed., pp. 476-497. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.

Willnow, U.; Dumon, K. (1996). In vitro-Untersuchungen der DNA-Syntheschemmung durch Hyperthermie (42,5°C, 120 min) und Zytostatika bei embryonalen Tumoren und Sarkomen des Kindesalters. *Langenbecks-Arch-Chir-Suppl-Kongressbd.* **113**, 1100-1101.

Wust, P.;Molls, M. (1999). Hyperthermie in Kombination mit Radiotherapie und/oder Chemotherapie. In *Kompendium Internistische Onkologie. Standards in Diagnostik und Therapie*. Hrsg. Schmoll, H. J.; Höffken, K.; Possinger, K.; 3. Auflage ed., Teil 1, 536-540, Springer-Verlag Berlin.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mir bei der Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit Unterstützung gaben, herzlichst bedanken. Insbesondere möchte ich danken:

Frau Dr. Ingrid Hilger für die allumfassende ausgezeichnete und herzliche Betreuung, die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen

Herrn Prof. Dr. med. Dipl. chem. Werner A. Kaiser für die Vergabe des vielseitigen und interessanten Themas

Frau Doreen Schröder für die vielen hilfreichen und praktischen Tips und die freundschaftliche Zusammenarbeit

Prof. Dr. rer. nat. Wilfried Andrä, Dr. rer. nat. R. Hiergeist, Dr. rer. nat. Rudolf Hergt und

Dr. rer. nat. R. Müller für aufschlußreiche Diskussionen bei physikalischen Fragestellungen

Prof. Dr. med. habil. Eberhard Straube für die Ermöglichung und **Frau Schade und Herrn Rost** für die Durchführung von Sterilisationsarbeiten

Prof. Dr. med. habil. Werner Linß und seinen Mitarbeiterinnen im Labor für die Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen

Barbara und Magdalene Steinmüller für die großzügige Unterstützung

Mark Dörr, der bei Problemen jeder Art mit Rat und Tat zu Seite stand,

Jens Gerhard und meinem Cousin **Uwe Herbert** für die Hilfestellung beim Erstellen der Zeichnungen

Georg Jungnitsch für die Bereitstellung des Ziplotwerks und meiner Mitbewohnerin **Wiebke Albrecht** für den Rechner

Ihr, meinem Vater, meiner Schwester Katrin und Dietrich für die liebevolle Versorgung und die unendliche Geduld und dafür, daß sie mir das Gefühl des Getragenseins gaben

Lebenslauf

Name: Sylvia Frühauf
Geboren am: 10. Juli 1975 in Bernburg
Anschrift: Frommannstraße 6
07743 Jena
Familienstand: ledig

Schulbildung

9/82-8/90 Polytechnische Oberschule „Ernst Thälmann“ in Bernburg
9/90-2/91 Gymnasium „Carolinum“ in Bernburg
3/91-8/94 Spezialschule math.-naturwiss.-techn. Richtung „Georg Cantor“ in Halle

Praktika

9/94-4/95 Au-pair in Poole/Großbritannien
5/95 Pflegepraktikum im St. Elisabeth Krankenhaus Halle
9/95 Pflegepraktikum im Kreiskrankenhaus Eisleben

Hochschulbildung

10/95-heute Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
10/95-9/97 4 vorklinische Semester
10/97-8/99 4 klinische Semester
9/99-3/00 Promotion
4/00-9/00 Erfahrungs- und Studienaufenthalt in der Gemeinde “El Buen Pastor” der Combonimissionare und im Hospital Goyenneche in Arequipa/Perú
10/00-11/01 Fortsetzung des Medizinstudiums und Überarbeitung des Dissertationsmanuskripts

Publikationen

Ingrid Hilger, Sylvia Frühauf, Werner Linß; Robert Hiergeist, Wilfried Andrä; Rudolf Hergt, Werner Kaiser (2001). Cytotoxicity of selected magnetic fluids on human adenocarcinoma cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*: angenommen

Ingrid Hilger, Sylvia Frühauf, Wilfried Andrä, Robert Hiergeist, Rudolf Hergt, Werner A. Kaiser (2001). Magnetic Heating as a Therapeutic Tool. *Thermology International* **11**, 130-136

Jena, im November 2001

Sylvia Frühauf

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Person bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat:

Frau Dr. rer. nat. Ingrid Hilger

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, im November 2001